

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Control genético de las etapas finales del ciclo celular de  
Escherichia Coli**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Antonio Tormo Garrido**

DIRECTOR:

**Miguel Vicente**

**Madrid, 2015**

TP  
003  
004

Antonio Tormo Garrido



\* 5 3 0 9 8 6 0 6 9 X \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-010565-3

CONTROL GENETICO DE LAS ETAPAS FINALES DEL CICLO CELULAR  
DE ESCHERICHIA COLI

Departamento de Genética  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1983



BIBLIOTECA

**Colección Tesis Doctorales. Nº 64/83**

**© Antonio Tormo Garrido**  
**Edita e imprime la Editorial de la Universidad**  
**Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía**  
**Noviciado, 3 Madrid-8**  
**Madrid, 1983**  
**Xerox 9200 XB 480**  
**Depósito Legal: M-6424-1983**

Autor: ANTONIO TORMO GARRIDO

CONTROL GENETICO DE LAS ETAPAS  
FINALES DEL CICLO CELULAR DE  
ESCHERICHIA COLI

Director: Miguel Vicente Muñoz  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Colaborador Científico del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Año 1981



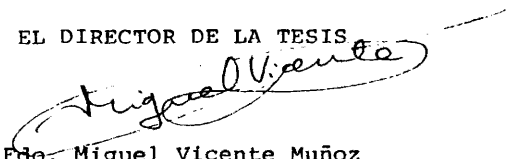
Memoria del trabajo que presenta  
ANTONIO TORMO GARRIDO para optar  
al Grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas.

Madrid, 15 de Octubre de 1981

Antonio Tormo Garrido

Vº Bº

EL DIRECTOR DE LA TESIS

  
Fdo. Miguel Vicente Muñoz

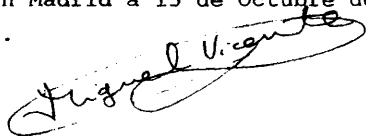


MIGUEL VICENTE MUÑOZ,  
Colaborador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, realizado por ANTONIO TORMO GARRIDO para optar al grado de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS y titulado "CONTROL GENÉTICO DE LAS ETAPAS FINALES DEL CICLO CELULAR DE ESCHERICHIA COLI" ha sido realizado bajo mi dirección en el Instituto de Biología Celular del C.S.I.C.

Y para que así conste, extendiendo el presente certificado en Madrid a 15 de Octubre de 1981.







A padre y madre



Mi agradecimiento a Concha Fernández-Cabrera por su incomparable ayuda a lo largo de todo el trabajo experimental y de preparación del manuscrito.

Quiero agradecer al Profesor Dr. José Luís Cánovas y a la Unidad Estructural de Investigación de "Fisiología y Genética Bacteriana" el haberme iniciado en el proceso de investigación del ciclo celular y el haberme concedido todas las facilidades para la realización de este trabajo. A Encarnación Martínez Salas, a Pepa Cabrera, a Mercedes Zazo, a Marisa Martínez Robles, a Santiago Conde y Lola Puebla por la ayuda que me han prestado.

Agradezco al Dr. Miguel Vicente el haberme dirigido esta tesis.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento al Profesor Dr. Juan Ramón Lacadena por haber aceptado la ponencia de esta tesis.



## **I N D I C E**

	<u>página</u>
ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMEN .....	1
1 INTRODUCCION .....	5
1.1 Control de la división .....	8
1.2 Envolturas celulares .....	11
1.3 Crecimiento en masa .....	16
1.4 Elongación celular .....	18
1.5 Crecimiento de la pared celular .....	21
1.6 Crecimiento en diámetro .....	23
1.7 Densidad celular .....	24
1.8 Replicación del cromosoma bacteriano .....	25
1.9 Septación .....	32
1.10 El gen <u>ftsA</u> . Agrupamiento de genes que inter vienen en la división alrededor del minuto 2 del cromosoma de <u>Escherichia coli</u> .....	34
1.11 Planteamiento de la tesis .....	37
2 MATERIALES .....	39
2.1 Material biológico .....	40
2.1.1 Material bacteriológico .....	40
2.1.2 Material virológico .....	41
2.2 Material químico .....	42
2.3 Equipo instrumental .....	43
3 METODOS .....	44
3.1 Condiciones de esterilización .....	45
3.2 Medios de cultivo .....	46
3.2.1 Medios líquidos de cultivo .....	46
3.2.2 Medios sólidos de cultivo .....	48
3.3 Conservación de las estirpes .....	49
3.3.1 Conservación de las estirpes bacterianas .....	49
3.3.2 Comprobación de marcadores .....	49
3.3.3 Conservación de las estirpes de fagos ...	49

3.4	Condiciones de cultivo .....	50
3.4.1	Cultivos en medio líquido .....	50
3.4.2	Cultivos en medio sólido .....	50
3.5	Medida de parámetros celulares .....	51
3.5.1	Medida de la concentración celular .....	51
3.5.2	Medida de la masa .....	51
3.5.3	Medida de viables .....	51
3.5.4	Medidas radiométricas .....	52
3.5.4.1	Técnicas generales .....	52
3.5.4.2	Tipos de marcaje .....	52
3.5.4.2.1	Células uniformemen te marcadas .....	53
3.5.4.2.2	Pulsos de timidina ....	53
3.5.5	Observación fotomicroscópica .....	53
3.6	Obtención de poblaciones sincrónicas .....	54
3.7	Empleo de inhibidores y de antibióticos .....	56
3.7.1	Inhibición de la síntesis de DNA .....	56
3.7.2	Inhibición de la síntesis de RNA .....	56
3.7.3	Inhibición de la síntesis de proteínas ..	57
3.7.4	Inhibición de la división .....	57
3.7.5	Empleo de antibióticos $\beta$ -lactámicos ....	58
3.8	Alineamiento cromosómico .....	59
3.9	Metodos virológicos .....	60
3.9.1	Obtención de lisados del fago P1 Kc .....	60
3.9.2	Titulación de los lisados .....	60
3.9.3	Transducción mediada por el bacteriófa- go P1 Kc .....	61
3.9.4	Lisogenización por el fago $\lambda$ .....	61
3.9.5	Prueba de lisogenia .....	62
4	RESULTADOS .....	64
4.1	Análisis de los mutantes termosensibles de di visión D-2 y D-3 .....	65
4.1.1	Efecto del cloramfenicol sobre filamen tos de las estirpes MAC-1 y MAC-3 .....	65



4.1.2	Transducción de las mutaciones <u>ftsA-2</u> y <u>ftsA-3</u> : obtención de las estirpes D-2 y D-3 .....	66
4.1.3	Análisis de complementación: compro- bación de que los alelos termosensi- bles de división presentes en las es- tirpes D-2 y D-3 son mutaciones del gen <u>ftsA</u> .....	70
4.1.4	Efecto del cloramfenicol sobre fila- mentos de D-3 .....	72
4.1.5	Análisis fenotípico de las estirpes D-2 y D-3 .....	72
4.1.6	Segregación de nucleoides a la tem- peratura restrictiva en las estirpes D-2 y D-3 .....	74
4.1.7	Medida de la duración del período de replicación en OV-2 a 30°C y 42°C .....	79
4.1.8	Medida de la duración del período D en las estirpes OV-2 y D-3 a 30°C .....	80
4.1.9	Divisiones residuales en OV-2 y D-3 durante un ayuno de timina .....	81
4.1.10	Recuperación de la división a 30°C tras la inactivación térmica del pro- ducto del gen <u>ftsA</u> .....	85
4.1.11	Efecto del tiempo de incubación a la temperatura restrictiva sobre el tiem- po de recuperación de la división tras el retorno a la temperatura permisiva en D-3 .....	87
4.1.12	Estudio de la septación, bajo condi- ciones permisivas, de filamentos de D-2 y de D-3 .....	90
4.1.13	Efecto del tiempo de generación de D-3 sobre el tiempo de recuperación de la división a la temperatura permisiva tras un pulso a 42°C .....	90

4.1.14	Localización temporal de la acción de la proteína FtsA .....	97
4.1.15	Efecto del tiempo de incubación a la temperatura restrictiva sobre el tiempo de recuperación de la división en D-2 ...	98
4.1.16	Efecto de la inhibición de la síntesis de DNA, de RNA, de proteínas y de la acción de la proteína FtsA sobre la recuperación de la división de filamentos de D-3 .....	101
4.1.17	Efecto de la inhibición de la síntesis de DNA, de RNA, de proteínas y de la acción de la proteína FtsA sobre la recuperación de la división de filamentos de D-2 .....	105
4.1.18	Resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos de los mutantes <u>ftsA</u> .....	106
4.2	Relación entre la proteína FtsA y la proteína de terminación .....	112
4.2.1	Alineamiento cromosómico .....	112
4.2.2	Localización de la acción de la proteína FtsA en relación con el ciclo de replicación .....	118
4.2.3	Diferencias en el período de síntesis y acción de la proteína de terminación entre las estirpes OV-2 y D-3 .....	119
4.2.4	La proteína FtsA se comporta como una proteína de terminación .....	125
4.2.5	Período de síntesis y acción de la proteína de terminación: diferencias existentes entre las estirpes OV-2, D-2 y D-3 ..	129
4.2.6	Necesidad de un pulso de síntesis de DNA para la inducción de la síntesis de la proteína de terminación .....	130
4.2.7	Carácter termosensible de la división en	

	poblaciones celulares de D-2 y de D-3 con su período de replicación finalizado...	133
4.3	Relación entre los procesos de replicación del cromosoma y la división celular .....	138
4.3.1	Necesidad de síntesis de DNA para que se recupere la división después de una inhibición de la síntesis de proteínas en OV-2 .....	138
4.3.2	Necesidad de elongación cromosómica pa ra que se reanude la división en célu las a las que se le ha inhibido la sín tesis de proteínas .....	143
4.3.3	La recuperación de la división celular, después de una inhibición de la sínte sis de proteínas, se puede realizar en ausencia de iniciación de replicación ...	145
5	DISCUSION .....	148
5.1	Hipótesis de trabajo. Criterios operacionales en el estudio de mutantes .....	149
5.2	El gen <u>ftsA</u> y el ciclo de división celular de <u>Escherichia coli</u> .....	151
5.3	Similitud entre las proteínas FtsA y de termi nación .....	157
5.4	Replicación y división. Inducción de la pro teína FtsA .....	162
5.5	Integración de nuestros resultados en el con texto de la teorías sobre la replicación y la división .....	167
6	CONCLUSIONES .....	173
7	BIBLIOGRAFIA .....	177

**A B R E V I A T U R A S**

aa:	Aminoácidos
C:	Período de replicación del cromosoma
CM:	Cloramfenicol
cpm:	Cuentas por minuto
D:	Período que transcurre desde el término de la replicación hasta la separación celular
d:	Tanto por uno de divisiones residuales o distancia en minutos entre dos marcadores
D.O.:	Densidad Óptica
f:	Frecuencia de cotransducción
G:	Equivalentes genómicos por célula
HU:	Hidroxiurea
$\bar{L}$ :	Longitud media de las células de una población
LBT <sub>20</sub> :	Medio rico (Luria Broth) suplementado con 20 $\mu$ g/ml de timina
$L_d$ :	Longitud de una célula al dividirse
$L_n$ :	Longitud de una célula al nacer
$\bar{M}$ :	Masa media de una población
$M_d$ :	Masa de división
$M_i$ :	Masa de iniciación
$M_n$ :	Masa de nacimiento
$\bar{M}_0$ :	Masa media teórica de una población con velocidad de crecimiento 0
$M_t$ :	Masa celular a la edad t
M9:	Medio mínimo (ver Métodos)
M9R:	Medio mínimo enriquecido (ver Métodos)
n:	Duración del período de replicación dividido por el tiempo de generación
NA:	Acido nalidíxico
PS:	Período de síntesis de proteínas necesarias para la división
R:	Velocidad de crecimiento
RF:	Rifampicina
T:	Período de constricción celular
U.A.:	Unidades de absorción

ufp: Unidades formadoras de placa

$\Lambda$ : Longitud teórica de una célula recién nacida creciendo  
con una velocidad de crecimiento 0

$\tau$ : Tiempo de generación



## RESUMEN



Los modelos actuales que describen el ciclo de división celular en Escherichia coli postulan la existencia de diversos procesos necesarios para la división pero independientes unos de otros. Estos procesos, según los modelos mencionados, se acoplan en algún momento del ciclo de división. Jones y Donachie (80) postularon que la replicación del cromosoma bacteriano y la división celular se encuentran acopladas a través de una hipotética proteína a la que denominaron "proteína de terminación", que se sintetizaría al término de la ronda de replicación y sería necesaria para la división celular. En ausencia de replicación, la síntesis de la proteína de terminación no se induciría quedando, en consecuencia, inhibida la división celular.

En este trabajo se han estudiado dos mutantes de Escherichia coli, las estirpes D-2 y D-3. Ambas están afectadas en el gen ftsA como se demuestra por análisis de complementación. Presentaremos pruebas que sugieren que el papel del producto del gen ftsA es el de una proteína de terminación.

Los alelos ftsA-2 (presente en la estirpe D-2) y ftsA-3 (presente en la estirpe D-3) son mutaciones termosensibles del gen de división ftsA. Dichas mutaciones se manifiestan a la temperatura restrictiva (42°C) pero no a la permisiva (30°C). En ausencia de actividad de la proteína FtsA las células aumentan tanto en masa como en longitud y DNA quedando detenida inmediatamente la división celular. Esta inhibición no es debida a la ausencia de segregación de los nucleóides ya que ésta se produce normalmente en condiciones restrictivas. La inactivación de la proteína FtsA se traduce en una filamentación celular. Los filamentos, en presencia de la proteína FtsA en forma activa, se dividirán al azar a través de los esbozos de septos que ya presentaban.

La inactivación de la proteína FtsA, por medio de choques térmicos en cultivos sincrónicos, muestra que su actuación ocurre durante los últimos estadios del ciclo de división. Así-

mismo, choques térmicos realizados sobre poblaciones de mutantes ftsA con su replicación sincronizada, nos muestran que su acción tiene lugar durante una fase tardía del ciclo de replicación. Estos resultados unidos al hecho de que no se produzca ninguna división residual tras la inactivación de la proteína FtsA, nos lleva a concluir que el producto del gen ftsA, la proteína FtsA, es necesaria en forma activa desde el término de la ronda de replicación hasta la separación de las células hijas. Es decir, su actuación se realiza durante todo el período de septación. Al ser este período constante, independientemente de la velocidad de crecimiento, el período de acción de la proteína FtsA también lo será, como se demuestra, ya que el tiempo necesario para que se recupere la división después de la inactivación de la proteína FtsA es constante e independiente del tiempo de generación.

Una incubación prolongada a la temperatura restrictiva en mutantes ftsA ocasiona que la división sea solo función de la síntesis y/o acción de la proteína FtsA. En estas condiciones el mutante ftsA-2, tras su retorno a condiciones permisivas puede dividirse en ausencia de síntesis de DNA y de proteínas. Por el contrario, el mutante ftsA-3 necesita, para que se recupere la división, un pulso de síntesis de DNA y síntesis de proteínas. Estos resultados nos indican que la proteína FtsA-2 es reversible tras su inactivación, mientras que la proteína FtsA-3 debe ser sintetizada de nuevo para que pueda ocurrir la división. Concluimos que la síntesis de la proteína FtsA es inducida por la replicación.

La conclusión anterior se ve apoyada por el hecho de que las células que han finalizado su período de replicación en ausencia de síntesis de proteínas (no habiéndose dividido por faltar la proteína FtsA entre otras posibles causas) necesitan para su división un pulso de replicación en presencia de síntesis de proteínas.

Las poblaciones de mutantes ftsA que completado todos

los requerimientos para la división, excepto la síntesis de la proteína de terminación, solo pueden dividirse a la temperatura permisiva y en presencia de síntesis de proteínas y de replicación. El tiempo necesario para que se sintetice y actúe la proteína de terminación requiere 20 minutos más en mutantes ftsA-3 que en estirpes ftsA<sup>+</sup>. Este tiempo es igual al necesario para que se sintetice y actúe la proteína FtsA-3.

En ausencia de actividad de la proteína FtsA las células presentan una resistencia muy superior a la lisis inducida por aquellos antibióticos  $\beta$ -lactámicos que inhiben la septación. La acción de éstos se ha relacionado con el inicio de los procesos de septación, particularmente con la proteína de terminación, posiblemente por cambios en el metabolismo del peptidoglicano. Parece coherente, a partir de nuestros resultados, que la diana de dichos antibióticos sea bien la proteína FtsA o los procesos en los que ella intervenga por sí misma o bien formando un complejo proteínico.

De todo lo anterior se concluye que los mutantes afectados en el gen ftsA se comportan como mutantes en la proteína de terminación. De todos modos si el gen ftsA codifica una proteína de terminación algunas ideas sobre dicha proteína se verían alteradas en cuanto que su acción podría alargarse desde una fase tardía del ciclo de replicación hasta el término de la septación y que su síntesis requeriría un pulso de síntesis de DNA. El papel de dicha proteína es posible que no solamente fuera la de acoplar los ciclos de replicación y de división sino que además tuviera un papel estructural en la formación del septo. Otra alternativa sería que la división requiriera la presencia continua de una señal reguladora hasta el término del septo. Esto implicaría una revisión de la definición de proteína de terminación dada por Jones y Donachie en 1973 (80).

## I N T R O D U C C I O N

Escherichia coli es una bacteria Gram Negativa de la familia Enterobacteriaceae. Su forma es bacilar teniendo una longitud que puede oscilar entre 1.4  $\mu\text{m}$  y 5.6  $\mu\text{m}$  (39). El habitat normal de esta bacteria es el intestino grueso de los animales. Si bien es simbiote, en ocasiones puede llegar a ser patógena.

Su estructura celular, aparentemente, muy sencilla, así como la facilidad de su cultivo han sido las razones por las que es estudiada intensivamente. Las principales aportaciones del estudio de este procarionte al campo de las ciencias biológicas han sido fundamentalmente bioquímicas y genéticas.

Nuestro interés se centra en la división celular y su regulación. La sencillez de E. coli en comparación con los organismos eucarióticos y la posibilidad de regular exactamente el medio de crecimiento hacen de este organismo procariótico un sistema biológico idóneo para los estudios fisiológicos. Además, el gran conocimiento a niveles bioquímicos, genéticos y fisiológicos junto con la extensa documentación que de los procesos de división de Escherichia coli se tienen, aconsejan su empleo en todo estudio que como el presente pretenda aportar conocimientos básicos a nivel de Biología Molecular.

E. coli en condiciones óptimas de temperatura, medio y oxigenación es capaz de dividirse cada 20 minutos. El bacilo crece en longitud hasta duplicarla, manteniendo constante su diámetro (112). Paralelamente al crecimiento en longitud sintetiza DNA lo que duplica el contenido genético. Los nucleoides (o material genético condensado) segregan yendo cada uno a cada futura célula hermana. Cuando estos procesos han ocurrido se observa que la célula se divide mediante la formación de un septo transversal al eje longitudinal, produciendo dos células que son estadísticamente iguales a como era la célula madre en el momento de su nacimiento.

En una primera apreciación se podría pensar que todos los procesos vitales implicados en la división comienzan con el naci

miento de la célula y terminan con la propia división. Sin embargo esto no sucede así. En determinadas ocasiones los procesos fisiológicos necesarios para la división celular no comienzan con el nacimiento sino varias generaciones antes. Obvio es decir que la aparente sencillez del proceso a medida que aumenta el conocimiento comienza a desaparecer. Esto es una clara consecuencia de los procesos selectivos ocurridos durante su evolución.

Entre los diversos procesos que ocurren normalmente antes de la división uno de ellos nos interesaba particularmente: la replicación del DNA y su relación con la división. La duplicación del material genético antes de que se produzca la división es esencial para la viabilidad de las células hijas. Una pérdida de material genético conduciría a la ausencia de funciones biológicas que resultarían, en la mayoría de los casos, en la muerte celular. Diversos autores han propuesto teorías opuestas acerca de las posibles relaciones entre replicación y división. Así Helmstetter et al., (62) postulan que las células pueden dividirse en ausencia de síntesis de DNA, mientras que Jones y Donachie (80) proponen que las células quedan inhibidas en su división si se detiene la síntesis de DNA. Este trabajo pretende aportar alguna luz acerca de las posibles relaciones replicación-división.

A continuación se expondrán diversos aspectos de ciclo celular de Escherichia coli para introducir el cuando y como de la división celular bacteriana.

### 1.1 CONTROL DE LA DIVISION

Los distintos modelos sobre el control de la división celular deben considerar diversos aspectos del ciclo celular tales como el crecimiento en longitud de la célula, replicación del DNA, etc.

Entre los diversos modelos propuestos discutiremos dos: el modelo de Jones y Donachie (80) y el de Pritchard y Zaritsky (140, 199). También se comentará brevemente un modelo estocástico del ciclo celular.

El modelo postulado por Jones y Donachie (80) presupone que la división celular requiere la finalización de dos secuencias paralelas que se inician, en condiciones normales, sincronicamente. La iniciación de la replicación ocurre cuando la razón entre la masa (o volumen) celular y el número de copias de ori C alcanza un valor determinado llamado Masa de Iniciación ( $M_i$ ) que es constante e independiente de la velocidad de crecimiento (35). El término de la replicación del cromosoma bacteria no ocurre 40 minutos después de la iniciación e induce la síntesis de la Proteína de Terminación. Paralelamente, pero de forma independiente de la replicación al alcanzarse el valor de la Masa de Iniciación, comienza el período de síntesis de proteínas necesarias para la división (PS). A los 40 minutos de comenzar, finalizaría este período. Coincidente con la terminación de la replicación (pero no dependiendo de ella) la célula alcanza una longitud crítica ( $2\lambda$ ), independiente de la velocidad de crecimiento (39), que ocasionaría una duplicación en la velocidad de elongación y quizás se coordinase con los procesos de división. La separación celular ocurriría 20 minutos después, tras la interacción entre un primordio de septo y la Proteína de Terminación. Este modelo implica la existencia de productos génicos reguladores que coordinarían con la división diversos procesos necesarios para ésta. En ausencia de dichos productos la división quedaría inhibida. Se han descrito productos reguladores de la división como las proteínas FtsA (4, este trabajo), Ftsd (11) y FtsZ (45, 68, 106, 180).

Zaritsky y Pritchard (199) y Pritchard (140) propusieron otro modelo de control de ciclo radicalmente distinto. Postulan que las células elongan a una velocidad constante (y dependiente de la velocidad de crecimiento) que se duplica al finalizar las rondas de replicación. Según este modelo, la célula estaría siempre intentando septar, pero, al aumentar las células en masa se produciría un incremento en la presión interna. Este hecho provocaría que las subunidades de envoltura fueran dedicadas a un crecimiento en longitud en vez de a la formación de un septo. De esta manera la presión permanecería constante. Al duplicarse la velocidad de síntesis de las envolturas celulares, la presión interna sería menor con lo que se permitiría la formación de un septo. Según este modelo, no hay una señal específica de división así como tampoco hay diferencias entre la formación del septo y la elongación.

Existen pruebas a favor y en contra de ambos modelos. Así por ejemplo, Donachie et al., (39) observaron que el cambio de velocidad de elongación ocurre siempre a un tamaño determinado ( $2\lambda$ ) independientemente de que esté inhibida la síntesis de DNA (y por tanto en ausencia de terminación de rondas de replicación). Kubitschek (91) por el contrario, observó que el volumen aumentaba linealmente en ausencia de síntesis de DNA: esto sugiere que un aumento en la velocidad de crecimiento requiere síntesis de DNA.

La constancia de la densidad celular (114) no parece compatible con el modelo de Pritchard. Por otra parte las predicciones de dicho modelo son altamente difíciles de comprobar.

Smith y Martín (161) elaboraron un modelo estocástico de división para células eucarióticas en el que sugerían que el ciclo de proliferación celular está compuesto de una fase probabilística previa a la iniciación de la replicación seguida de una fase determinística que incluía la replicación cromosómica y la división. Durante la fase probabilística la célula no progresa



hacia la división sino que puede permanecer en dicha fase con una constante de probabilidad de entrada en la fase determinista. Shields (158) propone también una transición al azar en el ciclo celular bacteriano. Así, Koch (83) concluye que la iniciación de la replicación del cromosoma bacteriano no dispara la división celular ya que la variabilidad de los tamaños celulares en el momento de la iniciación es mayor que la observable en el de la división. Una observación similar fue obtenida por Koppes y Nanninga (88,89) lo que les llevó a sugerir que el tamaño celular en la división está determinado estocásticamente en la iniciación de la replicación en E. coli. Koch (84) concluye que un solo acontecimiento estocástico en el ciclo celular no puede ser el temporizador de la división celular. De todas maneras y tal como postula Nurse (129) el ciclo celular debe presentar algún fenómeno determinístico aunque existan elementos probabilísticos.

## 1.2 ENVOLTURAS CELULARES

La observación al microscopio electrónico de la envoltura celular de bacterias Gram negativas en general y de Escherichia coli en particular demostró la naturaleza compleja de dicha envoltura. Inouye (76), Di Rienzo et al., (33) y Wright y Tipper (174, 194) han publicado dos interesantes revisiones acerca de este tema así como Herrero et al., (Herrero, E., Aldea, M. y Guerrero, R. Ciclo Celular en Bacterias. I. Aspectos Moleculares En a. Jiménez (Ed). Genética Molecular Bacteriana. Reverté. En prensa). La pared bacteriana situada por fuera del citoplasma, consta, en E. coli, de las siguientes capas de dentro afuera.

- 1ª) Membrana citoplásmica: presenta la típica estructura de bicapa lipídica y protéica con un espesor de 75 Å. En ella se encuentran sistemas de transporte activo y fosforilación oxidativa.
- 2ª) Peptidoglicano: también llamado Mureína o Glucopéptido. En Gram negativas es una capa fina de 25 Å de espesor. Forma un entramado rígido que rodea a la célula formando una supermacromolécula (sáculo). Confiere rigidez a la célula y le da forma. Evita que las células lisen en medios hipotónicos (ambiente habitual en muchas bacterias). Al ser eliminado el peptidoglicano las células adoptan, en medio isotónico, una forma esférica denominada esferoplasto.  
La estructura del peptidoglicano consiste en cadenas formadas por N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico alternativamente. Estas cadenas se unen por oligopéptidos que actúan como puentes entre las cadenas a través de las unidades de ácido N-acetil murámico. Se cree que las cadenas glucídicas se disponen de una manera paralela entre ellas y perpendicularmente al eje longitudinal de la bacteria (183).
- 3ª) Espacio periplásmico: se encuentra situado entre la membrana externa y el peptidoglicano. Tiene un grosor de 75 Å. Contiene proteínas transportadoras de azúcares y de aminoácidos específicos y enzimas hidrolíticas tales como fosfatasa alcali

na, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, fosfatasa de nucleótidos, etc. (18, 36, 64).

- 4<sup>a</sup>) Membrana externa: su constitución es similar a la membrana citoplásmica. Es de un grosor de 75 Å. Está compuesta de fosfolípidos y proteínas (como la citoplásmica). Además contiene lipopolisacáridos que ocupan alrededor de un 45% de la superficie de la membrana. La porción lipídica de los lipopolisacáridos (lípidos A) reemplaza a los fosfolípidos en la capa externa de la bicapa lipídica. La porción hidrocarbonada se extiende hacia afuera de la célula. El número total de proteínas de la membrana externa es relativamente bajo en comparación con la interna o citoplásmica, sin embargo, se encuentran en gran cantidad. Se dividen en proteínas de matriz, proteínas O<sub>2</sub>P<sub>2</sub>A, lipoproteína y otras proteínas minoritarias. La denominación de dichas proteínas es variable según los autores. Se ha seguido la terminología utilizada por Osborn y Wu (131).

La función de la membrana externa es la de confinar los enzimas y proteínas periplásmicos al espacio periplasmático. Es además una barrera selectiva que impide la entrada de compuestos tóxicos en la célula. Esto es especialmente importante en las Enterobacterias: la membrana externa protege a la citoplasmática de las sales biliares que la alterarían provocando lisis celular. Las cadenas hidrocarbonadas de los lipopolisacáridos impiden la entrada de ciertos compuestos hidrofóbicos. Tienen, además, un papel importante en la relación de la célula con el ambiente. Así mismo, en bacterias patógenas, tienen carácter de toxina.

Los nutrientes son transportados a través de la membrana externa por difusión pasiva. Al interior del citoplasma penetran por transporte activo a través de la membrana interna. Los sistemas transportadores activos están exclusivamente localizados en la membrana citoplásmica.

Entre las proteínas de la membrana se encuentran:

- Proteínas de la Matriz (OmpF y OmpC). Se caracterizan por su fuerte, aunque no covalente, asociación con el peptidoglicano. También se asocia con otra proteína mayoritaria de la membrana externa, la lipoproteína. Parece ser que la función de las proteínas de la Matriz es la formación de poros de difusión pasiva que permitan la difusión rápida de moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular a través de la membrana externa (124).
- Proteína OmpA: Parece que interacciona con el lipopolisacárido. Parte de esta proteína está expuesta en la parte exterior de la membrana. Tiene una función importante en la conjugación bacteriana y sirve como receptor de ciertos fagos.
- Lipoproteína: Esta proteína está covalentemente unida al peptidoglicano. Tiene 58 restos de aminoácidos. Está unida por el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina C-terminal al grupo carboxilo de cada décimo residuo ácido del peptidoglicano. La porción N-terminal de la lipoproteína es un resto de glicerilcisteína a la que están unidos dos ácidos grasos por uniones ester y un ácido grado unido por un enlace amida. Además de la lipoproteína unida a peptidoglicano ( $2.4 \times 10^5$  moléculas/célula) existe el doble de lipoproteína libre ( $4.8 \times 10^5$  moléculas/célula). Esta proteína es la más abundante, numéricamente, en la célula. Su función es todavía oscura, aunque se cree que interviene decisivamente en el mantenimiento de la integridad de la membrana externa.
- Proteínas Minoritarias: En ciertas condiciones de crecimiento llegan a ser tan abundantes como las mayoritarias. La función de estas proteínas es muy variada. Han sido identificadas como receptores de fagos y colicinas. Muchas intervienen en la entrada de sustratos a través de la membrana como hierro, maltosa o vitamina B<sub>12</sub>. Particularmente interesantes son las proteínas G y D. La función de la primera de ellas parece estar implicada en la coordinación de la replicación del DNA y la elongación celular. La proteína D, con un peso mole

cular de 80.000 daltons, se sintetiza, según Gudas et al., (52), justo antes de la iniciación de la replicación y su síntesis puede ser inhibida por ácido nalidíxico.

Un aspecto muy interesante de la envoltura celular por su relación con la morfología elongación y septación es la existencia de unas proteínas localizadas en la membrana interna llamadas PBP ("Penicillin Binding Protein"), llamadas así por unirse covalentemente a la penicilina y en general a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

El grupo de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Penicilinas y Cefalosporinas) afectan en gran manera al metabolismo del peptidoglicano. La mayor parte de estos antibióticos inhiben la división celular a bajas concentraciones mientras que producen lisis a altas. Ciertas  $\beta$ -Lactamas (Mecillinam) a concentraciones intermedias producen grandes deformaciones en la célula sin que quede inhibida la división celular. Estas distintas respuestas de la célula frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos parece que son debidos a la acción de estos sobre varios enzimas implicados en los últimos estadios del metabolismo del peptidoglicano. (Transpeptidasas, D-alanina carboxipeptidasa, endonucleasa de peptidoglicano, etc.). Se ha propuesto que los efectos de estos antibióticos sobre forma, división y elongación celular son debidos a su acción sobre distintos tipos de sistemas enzimáticos.

Las proteínas PBP ("Penicillin Binding Protein") son aquellas proteínas de la membrana interna que se unen covalentemente a la Penicilina y a sus derivados. Su localización es la esperada para aquellas proteínas que intervengan en los últimos estadios del metabolismo del peptidoglicano (162, 163, 164, 165, 166, 175). Mediante métodos de marcaje y electroforesis se han podido detectar la existencia de 8 PBP a las que se denominó PBP 1, PBP 2, etc., según fuera decreciendo su peso molecular. Las PBP 7 y 8 sólo se presentan en la estirpe B/r. Del estudio de mutantes afectados en alguna de las PBP y de la acción de distintos antibióticos  $\beta$ -lactámicos sobre la

fisiología celular, se ha podido concluir que las PBP 1, 2 y 3 están implicadas en los procesos de elongación, forma y división respectivamente. Si se inhibe la PBP 1 (por ejemplo, por acción de la cefaloridina, una cefalosporina que se une preferencialmente a dicha proteína) se detiene la elongación produciéndose lisis celular, probablemente por la acción continuada de hidrolasas en ausencia de síntesis de peptidoglicano. PBP 1 posiblemente actúe como una transpeptidasa que introduzca nuevos precursores en las cadenas de peptidoglicano en crecimiento. La síntesis de éste continúa incluso si las PBP 2 y/o PBP 3 son inhibidas (por acción del Mecillinam o de la cefalexina respectivamente o por acción de la temperatura en mutantes termosensibles para dichas proteínas). La inactivación de la PBP 2 produce grandes alteraciones en la morfología celular con pérdida de la forma bacilar. La inactivación de la PBP 3 produce una inhibición de la septación ocurriendo como consecuencia una filamentación de los bacilos. Es posible que la PBP 5 sea requerida para la formación del septo pero no para el crecimiento en longitud de las células. Quizás la PBP 3 actúe al término de una ronda de replicación alterando la dirección del crecimiento del peptidoglicano en un lugar potencial de división para la formación del septo. El gen que codifica la proteína PBP 3 está localizado en el minuto 2 y se denomina pbpB anteriormente llamado sep (4). Junto a él y formando un agrupamiento de genes que no son un operon (puesto que tienen varios promotores) se encuentran varios loci que intervienen en la síntesis de peptidoglicano y división. El significado de este agrupamiento es aún desconocido aunque se sabe que los genes de división localizados en dicho agrupamiento intervienen en la septación celular o en la síntesis de la pared celular (107).

### 1.3 CRECIMIENTO EN MASA

La velocidad de duplicación de partículas ( $R$ ) de una célula es el número de veces que se divide por hora. En Escherichia coli este valor oscila entre un valor máximo de 3 y un valor mínimo de 0. El tiempo de generación ( $\tau$ ) es el tiempo, normalmente expresado en minutos, comprendido entre el nacimiento de una célula y su división. La velocidad de crecimiento y el tiempo de generación se encuentran por tanto relacionados según la ecuación:

$$R = 60/\tau \quad 1$$

En condiciones de crecimiento exponencial balanceado, tanto la masa, como la cantidad de DNA, de RNA, de proteínas, de número de células, etc., crecen a la misma velocidad.

La masa media ( $\bar{M}$ ) de una población en fase de crecimiento exponencial es función de su velocidad de crecimiento. Esta relación se expresa en la ecuación:

$$\bar{M} = \bar{M}_0 2^R \quad 2$$

$\bar{M}_0$  es la masa media teórica de una población con velocidad de crecimiento cero. Esta relación se demostró para Salmonella typhimurium por Schachter et al., (153) y posteriormente para E. coli por Helmstetter et al., (58). Según el modelo teórico de distribución de edades de una población exponencial desarrollado por Powell (137) y suponiendo un crecimiento exponencial en masa desde el nacimiento de una célula hasta su división tendremos que:

$$M_n = \bar{M} \ln 2 = \frac{1}{2} M_d \quad 3$$

Donde  $M_n$  es la masa de nacimiento y  $M_d$  es la masa de la célula en el momento de su división. De las ecuaciones 2 y 3 se obtiene la ecuación:

$$M = \frac{M_n 2^R}{\ln 2} \quad 4$$

De esta relación se puede concluir que la masa máxima de una célula (es decir la de una célula creciendo con un tiempo de generación de 20 minutos en el momento de dividirse) es 8 veces mayor que la masa mínima (es decir, la de una célula creciendo con un tiempo de generación infinito, en el momento de su nacimiento).

Por otra parte, Abbo y Pardee (1), Cummings (26) y Ecker y Kokaisl (42) postularon que el crecimiento en masa de una célula desde el momento de su nacimiento hasta su división ocurre de una manera exponencial según la siguiente ecuación

$$M_t = M_n 2^{t/\tau} \quad 5$$

donde  $M_t$  es la masa de la células a los  $t$  minutos de su nacimiento.

Recientemente Kubitschek (92) ha puesto en duda este tipo de relación, postulando un crecimiento lineal de la masa durante el ciclo bacteriano.

El hecho de que aún no se haya podido decidir a favor de una u otra teoría acerca del crecimiento en masa (o longitud) durante el ciclo celular se debe en parte a la dificultad experimental de distinguir una cinética exponencial de una bilineal entre los valores 1 y 2. El error intrínseco de un experimento es similar a las diferencias existentes entre ambas cinéticas como puede deducirse con facilidad si se representan gráficamente.



#### 1.4 ELONGACION CELULAR

Las células de Escherichia coli pueden ser consideradas morfológicamente como cilindros con casquetes hemiesféricos. Desde el momento del nacimiento hasta su división las células duplican su volumen por aumento en la longitud exclusivamente, ya que el diámetro celular permanece constante a lo largo del ciclo (112) aunque recientemente se ha puesto en duda dicha constancia en el diámetro (177). La longitud celular media ( $\bar{L}$ ) depende de la velocidad de crecimiento ( $R$ ). Ambos parámetros se relacionan según la siguiente ecuación (39):

$$\bar{L} = (2 + 2R/3) \mu m \quad 6$$

Suponiendo una distribución de edades que se ajuste a la teórica de Powell (137) podemos calcular la longitud de nacimiento ( $L_n$ ) de una célula si conocemos la longitud media de la población:

$$L_n = \bar{L} \ln 2 \quad 7$$

De las ecuaciones 6 y 7 se puede concluir que el tamaño mínimo de E. coli (es decir de una célula recién nacida creciendo a una velocidad de 0) es de 1.39  $\mu m$ . A este valor se le denomina  $\lambda$  (39). El tamaño máximo de E. coli, calculado según las ecuaciones 6 y 7 y teniendo en cuenta que la longitud en el momento de la división es el doble de la de nacimiento, es igual a  $4\lambda$ . Esta longitud correspondería a una célula a punto de dividirse creciendo con una velocidad de  $R = 3$ .

Como ya se ha dicho antes, desde el nacimiento hasta la división se observa una duplicación de la longitud. El crecimiento durante el ciclo puede ser lineal, exponencial o lineal con una duplicación. La discriminación entre estas tres posibilidades como ya dijimos al hablar del aumento en masa es muy difícil, basándose en medidas a lo largo del ciclo, ya que las diferencias esperadas son menores al error experimental. Los distintos autores han tenido que recurrir a diferentes abordajes experimentales pa-

ra poder discernir entre las diversas posibilidades.

Diversos autores han propuesto que la elongación celular ocurre de una manera lineal con una duplicación en la velocidad de elongación aproximadamente 20 minutos antes de la división (25, 39, 50, 140, 198, 199).

Donachie et al., (39) y Cullum y Vicente (25) proponen el siguiente modelo:

- Existen un número determinado (posiblemente uno) de lugares de crecimiento para cada  $\lambda$  de longitud.
- El crecimiento en longitud en dichos lugares ocurre a una velocidad lineal, constante e inversamente proporcional al tiempo de generación.
- La velocidad de elongación de la célula dependerá, por tanto, del número de lugares de crecimiento y del tiempo de generación.
- Al alcanzar la célula un tamaño de  $2\lambda$  se duplica la velocidad de elongación de la célula al haberse duplicado el número de sitios de crecimiento. Sería en este momento cuando el crecimiento cambiase de unipolar a bipolar (9).
- Se inicia la septación cuando la célula, independientemente del tiempo de generación, alcanza un tamaño de  $2\lambda$  produciéndose la separación de las células hijas 20 minutos después.

Zaritsky y Pritchard (140, 198, 199) proponen también que la elongación se produce de una manera lineal con una duplicación en la velocidad. Según ellos la velocidad de elongación sería inversamente proporcional al tiempo de generación y directamente, al número de términos cromosómicos. Por otra parte la señal que llevaría a un doblaje en la velocidad sería la terminación de la replicación.

Pierucci (132) supone que la velocidad de elongación por lugar de crecimiento es constante e independiente del tiempo de generación. La velocidad de elongación de la célula sería función

del número de sitios existentes. Según su modelo, en cada iniciación de la replicación se producen nuevos lugares de elongación.

Finalmente Koppes et al., (89) postulan que el crecimiento en longitud de Escherichia coli ocurre de una manera exponencial a lo largo de su ciclo celular.

La coordinación entre la elongación celular y la división no es clara. Recientemente ha sido descrito por Martínez-Salas y Vicente (115) una mutación en el gen wee que afecta al control de la elongación o a la coordinación entre este proceso y la división celular. En ausencia del producto del gen wee las células se dividen a una longitud menor que la característica correspondiente al tiempo de generación con el que se encuentran creciendo. El producto del gen wee, por tanto, pudiera ser una señal acopladora entre la elongación celular y la división.

### 1.5 CRECIMIENTO DE LA PARED CELULAR

Se han propuesto diversos modelos de crecimiento de las envolturas celulares a lo largo de la vida de Escherichia coli. Los resultados experimentales obtenidos hasta la fecha son contradictorios, existiendo datos que apoyan un modelo u otro. Si existen zonas de crecimiento o no y en caso de su existencia su localización son temas aún sujetos a debate. El modelo más antiguo fue el propuesto por Jacob et al., (78) que supone la existencia de una zona ecuatorial de crecimiento. Al elongar la célula y encontrarse la zona de crecimiento entre las dobles cadenas de DNA, que se encontrarían unidas a la envoltura celular, actuaría el crecimiento de la pared como un mecanismo mitótico.

La existencia de zonas de crecimiento diferenciadas ha sido propuesta por diversos autores. Keppes y Autissier (82) concluyeron, tras estudiar la distribución de la permeasa de la lactosa en la membrana citoplasmática, que el crecimiento se realiza a través de una zona discreta. Ryter et al., (146) propusieron que la zona de crecimiento se localiza en una banda central de la célula. La utilización de ácido diaminopimélico marcado les permitió observar que esta molécula se incorpora en la zona central del peptidoglicano para, posteriormente, distribuirse al azar por todo el sáculo.

Schwarz et al., (156) sugieren que las zonas de crecimiento actúan como aparato mitótico y postulan, además, la existencia de dos tipos de zonas de crecimiento: una estrecha que estaría implicada en la división y otra ancha que estaría implicada en la elongación.

Ryter et al., (147) y Begg y Donachie (8, 9) estudiando proteínas receptoras de fagos observan que dichas proteínas se sintetizan en zonas localizadas de la membrana externa de E. coli. Así Ryter et al., (147) proponen que la zona de crecimiento ocupa una banda central mientras que Begg y Donachie (8, 9) sugieren que el crecimiento ocurre, en células pequeñas, en uno de los polos

celulares pasando a un crecimiento bipolar al alcanzar la célula un tamaño determinado.

Los datos en contra de una zona específica de crecimiento se basan en la incorporación al azar de los lípidos de la membrana (97) así como en la inserción, también al azar, de las proteínas mayoritarias de la membrana externa observada por Begg (7).

En cuanto a la incorporación de precursores en las envolturas celulares Boyd y Holland (14) observan que las proteínas totales y de la membrana interna se incorporan de una manera exponencial, mientras que las proteínas de la membrana externa lo hacen linealmente con una duplicación en la velocidad unos 15 minutos antes de la división. También observaron que la velocidad de incorporación es independiente de síntesis de DNA no encontrándose regulado por mecanismos de duplicación génica. Estos resultados apoyan la hipótesis de Donachie et al., (39) y de Cullum y Vicente (25) que postulan que la duplicación en la velocidad de elongación es independiente de la síntesis de DNA en contra de Zaritsky y Pritchard (140, 198, 199) que suponen que la velocidad de elongación es directamente proporcional al número de términos cromosómicos.

#### 1.6 CRECIMIENTO EN DIAMETRO

Escherichia coli desde su nacimiento hasta su división duplica su volumen por aumento en longitud. El radio permanece constante a lo largo del ciclo según observaron Marr et al., (112) Recientemente Trueba y Woldringh (177) han sugerido una variación en el diámetro celular a lo largo del ciclo. Según su propuesta, se produce una disminución en el radio desde el nacimiento hasta la constricción, momento en el que volvería a aumentar.

Al aumentar la velocidad de crecimiento se produce un aumento en el volumen debido no solo a un incremento en la longitud sino también en el diámetro (50, 152). En mutantes auxotróficos para la timina se puede alargar el período de replicación por limitación en la concentración de esta base sin que disminuya la velocidad de crecimiento. Este aumento en el período de replicación va unido a un incremento en el volumen celular debido según Meacock et al., (121) y según Zaritsky y Pritchard (199) a un aumento en el diámetro. Dicho aumento sería inversamente proporcional a la concentración en DNA (número de equivalentes genómicos por masa celular). Posteriormente Pritchard et al., (142) de secharon esta posibilidad al observar, en mutantes dna A crecidos a temperaturas intermedias entre las permisiva y restrictiva, que el aumento en diámetro era independiente de la concentración en DNA. Por otra parte, Begg y Donachie (10) han observado que el aumento en volumen, al alargarse el período de replicación, no es debido a un incremento en el radio (que permanece constante) sino en la longitud. El mismo resultado fue obtenido por Pritchard et al., (142) al observar que el aumento en volumen, al producirse una disminución en la concentración de DNA, era debido a un incremento en la longitud, permaneciendo constante el diámetro.

### 1.7 DENSIDAD CELULAR

Se han propuesto diversos modelos de crecimiento en masa, longitud y radio a lo largo de la vida de E. coli. La masa y la longitud, a lo largo del ciclo, oscilan entre unos valores relativos de 1 y 2, hecho que dificulta la apreciación entre los dos modelos básicos: crecimiento exponencial o crecimiento lineal con una duplicación en un momento determinado del ciclo. Si el volumen (o la longitud, ya que el diámetro celular parece que se mantiene constante o varía muy poco) y la masa aumenta según cinéticas de crecimiento distintas se deberán observar variaciones en la densidad de las células a lo largo de su vida, presentándose la mayor variación en el momento en que la velocidad se duplicase en la cinética lineal.

Aunque existe algún dato experimental (136) acerca de variaciones en la densidad durante el ciclo celular, los resultados más recientes, obtenidos por Martínez-Salas et al., (114) y Woldringh et al., (comunicación personal) indican que la densidad de Escherichia coli es constante a lo largo del ciclo. Asimismo observaron que la densidad es constante independientemente de la velocidad de crecimiento (1.105 g/ml). Estos resultados indican que las cinéticas de aumento en masa y volumen son paralelas. Por tanto, si el diámetro celular permanece constante, la cinética de aumento en longitud deberá ser paralela a la presentada por la masa y el volumen. Si por el contrario el diámetro disminuyera a lo largo del ciclo hasta el inicio de la constricción para aumentar después (177) la cinética de aumento en longitud no correspondería a ninguna de las descritas (exponencial o bilineal).

### 1.8 REPLICACION DEL CROMOSOMA BACTERIANO

El cromosoma de Escherichia coli es una molécula circular de DNA de doble cadena con un peso molecular de  $2.5 \times 10^9$  daltons y una longitud entre 1.0 y 1.4 mm. Se encuentra condensado en la célula formando una estructura denominada nucleoide.

Jacob et al., (78) sugirieron que el cromosoma bacteriano se encuentra asociado a la membrana celular mediante una unión que posiblemente intervenga en la regulación de la síntesis de DNA y en la segregación de los cromosomas. Leibowitz y Shaeter (95) y Thilo y Vielmetter (172) propusieron que el cromosoma se encuentra unido a la envoltura celular probablemente a través del lugar de replicación y/o el origen y el término cromosómico. Wolf-Watz y Norquist (193) demostraron la existencia de una proteína de la membrana externa con un peso molecular de 31000 daltons que presenta una unión específica con el cromosoma bacteriano, posiblemente a través del origen de replicación ori C (191).

La replicación del DNA de E. coli comienza en un lugar específico del cromosoma denominado ori C y localizado en el minuto 83 del mapa genético. Dicho origen de replicación ha sido clonado por Yasuda e Hirota (196).

A partir de ori C la síntesis del cromosoma bacteriano procede de una manera bidireccional y semiconservativa (13) hasta llegar a un lugar localizado en una zona diametralmente opuesta a ori C. Dicha zona, denominada ter C, se encuentra entre los minutos 32 y 34 del mapa genético de Escherichia coli (100). Louarn et al., (100) sugirieron que las horquillas de replicación quedan detenidas en ter C no pudiendo avanzar a partir de esta zona. Es interesante hacer notar que ter C se encuentra en una zona del cromosoma que, según parece, es genéticamente silenciosa (4). Por otra parte, Edlund et al., (43) proponen que la terminación de la replicación ocurre al encontrarse las dos horquillas de replicación, o bien, si la replicación es unidireccional, por efecto de baja concentración de timina en cepas auxotró-



ficas, cuando la horquilla de replicación completa una ronda. La iniciación de la replicación es un proceso complejo que requiere síntesis de proteínas y de RNA según demostraron Lark et al., (94) y Laaløe y Manawalt (109).

El tiempo mínimo que tarda una célula en replicar su cromosoma es de 40 minutos (12, 110) y sin embargo puede llegar a duplicar su contenido en DNA en tiempo tan cortos como 20 minutos. Este hecho, que puede parecer una contradicción, es debido a la posibilidad que tiene E. coli (así como otras bacterias estudiadas) de comenzar nuevas rondas de replicación (es decir, de que se produzcan nuevas iniciaciones) antes de que las horquillas de replicación en curso finalicen su síntesis de DNA (57, 197). Así Bird y Lark (12) observaron que la frecuencia de iniciaciones aumenta a medida que aumenta la velocidad de crecimiento, permaneciendo constante la duración del período de replicación. Helmstetter y Pierucci (61) estiman que la máxima frecuencia de iniciación puede estar determinada por la mínima distancia permitida entre horquillas de replicación. Marvin (117) sugiere que las nuevas rondas de replicación se inician cuando el área de la membrana que se encuentra alrededor de un lugar de replicación aumenta lo suficiente como para permitir la formación de un nuevo lugar de replicación.

Helmstetter et al., Donachie y Pritchard et al., (35, 58, 139, 141) observaron que el tamaño (masa o volumen) medio por origen de replicación en la iniciación es relativamente constante en células creciendo a 37°C con un tiempo de generación inferior a 70 minutos. Se producen  $2^n$  iniciaciones en  $2^n$  copias del origen de replicación cuando la célula alcanza una masa igual a  $2^n \times M_i$ .  $M_i$  o Masa de Iniciación es la masa que tiene una célula creciendo con un ciclo de 60 minutos en el momento de su nacimiento, momento que coincide con el comienzo de la replicación, y  $n$  es un número entero cualquiera. Recientemente Grossman y Ron (49) han puesto en duda el modelo anterior al observar que, bajo ciertas condiciones, se produce un desacoplamiento entre la iniciación

de la replicación y la adquisición de la masa de iniciación, de tal manera que, tras una inhibición de la síntesis de proteínas, la iniciación de la replicación ocurre a una masa menor que la masa de iniciación. Por otra parte, Churchward et al., (29) han observado que en B/r la Masa de Iniciación llega a duplicarse cuando las células crecen a una velocidad entre 0.6 y 1.6 duplicaciones por hora, permaneciendo constante a mayores velocidades.

Helmstetter et al., (62) resumen de la siguiente manera los posibles requerimientos de una célula para iniciar su proceso de replicación:

- Formación del aparato replicativo con los correspondientes enzimas para la replicación.
- Síntesis de los componentes de la envoltura que puedan estar implicados en la replicación.
- Activación o desinhibición de genes esenciales para la iniciación.
- Avance de las horquillas ya existentes hasta una distancia que no interfiera con la formación y actuación de otras nuevas.
- Crecimiento celular hasta un tamaño crítico.

Una vez que se ha producido la iniciación de la replicación esta continúa su curso hasta el término. El período de replicación, también llamado período C, tiene una duración constante de 40 minutos para velocidades de crecimiento superiores a una duplicación por hora (12, 110). Como ya se ha indicado antes las células pueden tener un período de replicación de duración superior a su tiempo de generación gracias a la posibilidad de haber solapamiento en rondas de replicación. Las configuraciones cromosómicas para distintos tiempos de generación y de replicación se encuentran descritas en las revisiones de Helmstetter et al., (58) y de Donachie et al., (40). Para tiempos de generación superiores a 60 minutos, la constancia del período de replicación está puesta en duda en base a resultados obtenidos por

Helmstetter y Pierucci (61) en la estirpe B/r A en las que se puede observar que el período de replicación aumenta proporcionalmente a la duración del tiempo de generación. Por otra parte, Kubitschek y Freedman (93) y Chandler et al., (27) observaron que el período C permanece constante independientemente de la velocidad de crecimiento. Por otra parte, al también mantenerse constante el período de tiempo entre el término de la ronda de replicación y la división celular (93), queda implícita la existencia de un período denominado período B, durante el cual no se produce síntesis de DNA. Dicho período B sería el comprendido entre el nacimiento y la iniciación de la replicación.

El período de replicación puede alargarse hasta una duración indefinida mediante limitación de precursores de DNA en mutantes auxótrofos para dichos precursores (143). Bajo estas condiciones, la velocidad de polimerización del DNA disminuye, provocando, como es lógico, un aumento en la duración de C. Este hecho no lleva necesariamente aparejado un alargamiento en el tiempo de generación ya que pueden producirse nuevas iniciaciones con el consiguiente solapamiento de rondas de replicación.

Una vez se ha producido la iniciación de la replicación esta puede continuar hasta su término en condiciones de inhibición de síntesis de proteínas (34, 94, 109). Sin embargo, Marunouchi y Messer (116) observaron que si se inhibe la síntesis de proteínas durante un tiempo lo suficientemente largo como para que terminen las rondas de replicación en marcha, la división no se hace resistente a ácido nalidíxico. Dix y Helmstetter (34) observaron el mismo hecho aunque la división sí se producía si se quitaba la timina del medio (en mutantes con esta auxotrofia) al desbloquear la síntesis de DNA. Marunouchi y Messer (116) propusieron que durante una inhibición de la síntesis de proteínas la replicación continúa hasta casi el término, quedando sin replicar un segmento de la región terminal con un tamaño de un 0.5% del cromosoma. El hecho de que se produzca división en ausencia de timina sería explicable por la existencia de un contenido inter-

no de dicha base que permitiese la replicación de dicho segmento. Loehr y Hanawalt (99) y Marsh y Hepburn (113) observaron que en las condiciones descritas por Marunouchi y Messer (116) no se produce la replicación del segmento terminal del cromosoma, aunque Marsh y Hepburn (113) observaron que durante un ayuno de timina se produce una variable aunque limitada replicación en el origen. Por su parte, Helmstetter *et al* (62) sugieren que el ácido nalidíxico tiene un efecto inhibitorio sobre la división celular, aparte del que tiene sobre la replicación.

El estudio de mutantes afectados en la síntesis del DNA ha podido llevar a la caracterización de diversas proteínas cuyas funciones son esenciales en la replicación del cromosoma bacteriano. Estos mutantes pueden estar afectados en la iniciación de la replicación, en la elongación del cromosoma o en ambos procesos. Lógicamente son mutantes condicionales, termosensibles o criosensibles. Wickner (184) en una revisión sobre las proteínas de replicación de *Escherichia coli* resume las funciones de éstas así como los loci que las codifican en la tabla I. Esta ha sido ampliada con datos de Kornberg (90) y de Bachmann y Low (4).

Tabla I Loci relacionados con la síntesis de DNA.

Iniciación de la Replicación		
Locus	Posición	caracterización
<u>dna A</u>	82	48 K; actua de forma positiva contrarrestando un control negativo que bloquea la iniciación
<u>dna B</u>	91	250 K; subunidades de 48 K; 10 mo léc./cél; rNTPasa estimulada por DNA de cadena sencilla
<u>dna C(D)</u>	99	25 K; interacciona física y funcionalmente con la proteína DnaB
<u>dna I</u>	39	desconocida
<u>dna J</u>	0.5	desconocida

Tabla I (Continuación)

Locus	Posición	caracterización
<u>dna K</u>	0.5	desconocida
<u>dna P</u>	84	mutante de membrana
<u>rpo A</u>	72	subunidad $\alpha$ de la RNA polimerasa
<u>rpo B</u>	89	subunidad $\beta$ de la RNA polimerasa
<u>rpo C</u>	89	subunidad $\beta'$ de la RNA polimerasa
<u>rpo D</u>	66	subunidad $\gamma$ de la RNA polimerasa
Elongación del cromosoma		
Locus	Posición	caracterización
<u>dna B</u>	91	ver iniciación
<u>dna C(D)</u>	99	ver iniciación
<u>dna G</u>	66	65 K; 10 molec./cel.; primasa
<u>dna L(K)</u>	28	desconocida
<u>lig</u>	51	DNA ligasa
<u>dna X</u>	10	subunidad $\delta$ de la DNA polimerasa III
<u>dna Y</u>	12	desconocida
<u>dna Z</u>	10	subunidad $\gamma$ de la DNA polimerasa III
<u>pol C (dna E)</u>	4	subunidad $\alpha$ de la DNA polimerasa III
<u>pol A</u>	85	exonucleasa 5'-3' de la DNA polimerasa I
<u>gyr A (cou)</u>	82	subunidad $\beta$ de la DNA girasa sensible a novobiocina y coumermicina
<u>gyr B (nal A)</u>	48	subunidad $\alpha$ de la DNA girasa sensible a ac. nalidixico y oxolínico
<u>rep</u>	83	DNA helicasa
<u>pol B</u>	2	DNA polimerasa II
<u>ssb</u>	91	proteína de unión a DNA de i cadena

En cuanto a la regulación de la replicación del cromosoma bacteriano se han sugerido dos modelos:

1.- Regulación positiva: Jacob et al (78) sugieren que para la replicación hay una estructura o sustancia cuya presencia es necesaria para que ocurra. Su síntesis se produciría a una velocidad que estaría determinada por la velocidad de crecimiento. Un modelo de regulación positiva sería también el propuesto por Maaløe y Kjeldgaard (110), por Helmstetter et al (58) y por Donachie y Masters (41) que postula la existencia de un activador que o bien se sintetizaría a un tiempo determinado del ciclo celular o bien se iría acumulando a lo largo del ciclo hasta alcanzar una concentración crítica que dispararía la iniciación de la replicación.

2.- Regulación negativa: este modelo elaborado por Pritchard et al (141) propone la existencia de un inhibidor de la iniciación que estaría codificado por un gen cuya localización estuviese próxima a oriC. Este gen se transcribiría tras su replicación, sintetizándose una concentración determinada de inhibidor independientemente de la velocidad de crecimiento. La presencia del inhibidor a una concentración crítica impediría la existencia de nuevas iniciaciones. La concentración iría disminuyendo a medida que la célula aumentase en volumen a lo largo de su vida. La dilución del inhibidor llegaría a tal punto que permitiría la formación de nuevos complejos de iniciación. La velocidad de dilución del inhibidor (que sería inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento) determinaría la frecuencia de iniciaciones. Los resultados de Grossman y Ron (49) parecen ir en contra de este modelo. En efecto, tras una inhibición de la síntesis de proteínas, observaron que se producía una nueva iniciación a un tamaño menor al normal. Por tanto, la concentración del inhibidor, si es que existiese tal, no habría caído a un nivel que permitiese nuevas iniciaciones.

### 1.9 SEPTACION

Al tiempo que transcurre desde el término de la replicación del cromosoma bacteriano hasta la separación celular se le denomina período D. Durante este período ocurren los procesos de septación. Se denomina período T al tiempo que transcurre desde que pueden visualizarse las constricciones en células en división hasta la división celular.

Se llama septo al tabique transversal que separa las células hermanas. Se forma por un crecimiento centrípeto de la membrana citoplásmica y del peptidoglicano de la pared. La membrana externa no forma parte del septo hasta que las células comienzan a separarse (15,16). Sin embargo, durante la formación del septo, éste se va separando por lo que al microscopio se observa una constricción (87). Todos los materiales necesarios para la septación han sido sintetizados durante el período de replicación. Así la división (y por tanto la formación del septo) durante este período se hace resistente a la inhibición de síntesis de DNA, de RNA y de proteínas (16, 20, 60, 94, 152). Burdett y Murray (15, 16) postulan tres fases en el proceso de septación:

- 1.- Modificación de la pared bacteriana mediante la ruptura del entramado del peptidoglicano por acción de enzimas hidrolíticas. Este proceso ocurriría al término de la replicación y la modificación se localizaría en la zona de crecimiento de la pared.

- 2.- Iniciación de la síntesis de la pared y membrana del septo mediante el ensamblaje y organización de los precursores ya sintetizados.

- 3.- Crecimiento centrípeto de la membrana externa y separación física de las células. La separación fisiológica de las células hermanas ocurre justo antes de la separación física.

La duración del período D, definido como el tiempo que transcurre entre el término de la replicación y la división, es constante e igual a 20 minutos para células creciendo a una velo-

ciudad mayor a una duplicación por hora (23). Se ha observado que si el período de replicación es mayor de 40 minutos, D se acorta (120). Por el contrario, a velocidades de crecimiento menores a una duplicación por hora, D sufre un aumento, pudiendo llegar a valores de 53 minutos (62).

Al comienzo del período D ocurren los siguientes sucesos:

1.- Término de la ronda de replicación más antigua.

2.- Segregan los dos nucleoides yendo cada uno a cada lado de la célula. A velocidades mayores a dos duplicaciones por hora la separación de los cromosomas se va realizando durante la replicación (189). La segregación, según postularon Jacob *et al* (78), parece ser debida al crecimiento de las envolturas celulares entre los lugares de unión de los nucleoides a la membrana. El patrón de segregación de los cromosomas está aún poco claro: se ha descrito que la segregación ocurre de una manera al azar (111,145) o bien de una manera orientada (24, 135).

3.- Finaliza un período de síntesis de proteínas necesarias para la división. Este período, descrito por Pierucci y Helmstetter (134) sería concomitante con el período de replicación (período C) y de igual duración a él, es decir, 40 minutos. Este período, también llamado período PS, puede ser desfasable del período C.

4.- Se sintetizan y actúan la(s) proteína(s) de terminación. Esta(s) proteína(s) cuya existencia fue postulada por Jones y Donachie (80) se sintetizaría(n) al término de la ronda de replicación y sería(n) necesarias para la división celular. Su función y significado serán discutidos más adelante.

5.- Activación de autolisinas. El comienzo del período D coincide con una mayor sensibilidad a la penicilina (69).

6.- Unos minutos después de comenzar el período D se empieza a visualizar el septo, que finalizará su síntesis unos 10 minutos después a velocidades de crecimiento superiores a una duplicación por hora. Este período, llamado T, parece ser que se alarga a velocidades de crecimiento inferiores a una duplicación por hora hasta un valor aproximado de  $1/6$  del tiempo de generación (189).



#### 1.10 EL GEN ftsA. AGRUPAMIENTO DE GENES QUE INTERVIENEN EN LA DIVISION ALREDEDOR DEL MINUTO 2 DEL CROMOSOMA DE ESCHERICHIA COLI

En 1964 van de Putte (178) obtuvo, por primera vez, una colección de mutantes termosensibles afectados en los procesos de división a los que dividió en dos clases según la capacidad que tuviesen de sintetizar DNA a la temperatura restrictiva. Consideró como mutantes propiamente de división aquellos que a la temperatura restrictiva presentaban crecimiento, síntesis de proteínas y síntesis de ácidos nucleicos. A esta categoría pertenecían dos estirpes que albergaban las mutaciones fts-10 y fts-12 que fueron posteriormente denominadas ftsA(Ts) (67,186) por ser aparentemente alélicas de la mutación ftsA presente en la estirpe PAT-84 aislada por Hirota et al (68). Posteriormente Lutkenhaus y Donachie (104) aislaron un fago lambda transductor que en condiciones de lisogenia complementaba a los mutantes ftsA confirmandoles termorresistencia. Asimismo obtuvieron un fago lambda transductor portador del alelo ambar ftsA-16, mutación presente en la estirpe OV-16 (38,104), mediante el que pudieron identificar el producto del gen ftsA: una proteína con un peso molecular de 50.000 daltons. Los análisis de complementación realizados con fagos transductores mostraron que las mutaciones fts-10, fts-12 y ftsA-16 son formas alélicas del gen ftsA (106), así como también lo es la mutación ts-1882 (3,180). Por el contrario, Lutkenhaus et al (106) mostraron que la mutación termosensible presente en la estirpe PAT-84 (68) no es un alelo del gen ftsA sino de otro que se encuentra localizado entre ftsA y envA al que denominaron ftsZ. El término ftsA también fue utilizado por Taylor (170) para referirse a los mutantes resistentes a azida, proponiendo el nombre de azi como sinónimo más antiguo, ya que se pensó que ftsA y azi eran un mismo gen. Wijsman (186) demostró que ftsA y azi corresponden a loci distintos.

La zona del cromosoma en la que se encuentra el gen ftsA

tiene una longitud de 20.8 pares de kilobases (45) conteniendo un mínimo de 10 loci que intervienen en los procesos de división y/o en la biosíntesis del peptidoglicano. El orden de estos genes en el mapa cromosómico de Escherichia coli es:

pbpB murE murF murG murC ddl ftsQ ftsA ftsZ sulB envA azi

(11,45,47,79,106,107,125,148,186,187).

- pbpB también llamado sep o ftsI (45, 165,168) corresponde al gen que codifica la PBP-3, necesaria en la septación.
- murE (102,186) codifica la enzima que adiciona ácido meso-diaminopimélico a la mureína.
- murF (101,186) codifica a la enzima que adiciona D-alanil-D-alanina.
- murG (148) se desconoce su función aunque se sabe que interviene en la biosíntesis de la mureína. Peso molecular de 48 kilodaltons (107).
- murC (101,186) codifica a la enzima que adiciona L-alanina a la mureína. Peso molecular de 65 kilodaltons (107).
- ddl (103) codifica a la D-alanina: D-alanina ligasa. Peso molecular de 30 kilodaltons (107).
- ftsQ (11) Interviene en la septación. Peso molecular entre 20 y 30 kilodaltons.
- ftsA (38,104, este trabajo) Interviene en la septación. Actúa como una proteína de terminación. Peso molecular de 50 kilodaltons.
- ftsZ (45, 68,106,180) Interviene en la iniciación de la septación. Peso molecular de 45 kilodaltons (107).
- sulB supresor de lon (47,79).
- envA (107, 126,127,128,192) posiblemente codifique a la enzima N-acetilmuramyl-L-alanina amidasa. Peso molecular de 31 kilodaltons.
- azi resistencia a azida, filamentación a 42°C (170).

Los mutantes mur y ddl son mutantes lts, es decir, que lisan a la temperatura restrictiva. La mutación pbpB y las mutaciones fts y azi provocan una inhibición de la división a la tem

peratura restrictiva con la consiguiente filamentación de las células. La mutación envA provoca la formación de cadenas de células. Este agrupamiento de genes se encuentra organizado en, al menos, cuatro unidades de transcripción (148), siendo los promotores funcionales incluso cuando se encuentran transpuestos en otro lugar del cromosoma (148). Los genes ftsA, ftsQ y ftsZ no están constituidos en un solo operón sino que forman un mínimo de dos unidades de transcripción, compartiendo, posiblemente, ftsA un promotor con ftsQ o ftsZ, teniendo estos dos últimos genes promotores independientes (11). Por otra parte los genes murC, ddl y posiblemente murG se encuentran formando un único operón (107,148). La razón y el significado de este agrupamiento es aún desconocido. El hecho de que estos genes no se encuentren agrupados en un operón lleva a preguntarse si este agrupamiento es o no fruto de la casualidad. Otros agrupamientos de este tipo, es decir de varios operones juntos, se da también en Escherichia coli, como por ejemplo con los genes que intervienen en la transcripción y en la traducción (4).

### 1.11 PLANTEAMIENTO DE LA TESIS

Desde casi los comienzos del estudio del ciclo celular de Escherichia coli se observó que una inhibición de la síntesis de DNA impedía la división celular. La necesidad del término de una ronda de replicación para que se produzca división celular fue postulado por diversos autores como Clark (20,21), Clark y Maaløe (22), Helmstetter y Pierucci (60), Helmstetter et al (58), Hoffman et al (69), etc.

La existencia de una proteína, denominada proteína de terminación, que se sintetizaría al término, y solo al término, de una ronda de replicación y cuya acción sería necesaria para la división celular fue postulada por Jones y Donachie (80). El significado de esta proteína sería, claramente, el de impedir la formación de células sin cromosoma o parcialmente defectivas en contenido genético. Aseguraría que la división quedase detenida, al menos, hasta que se hubiese producido una duplicación del material genético. Sin embargo, diversos autores han propuesto (62) que la replicación del cromosoma bacteriano no es un requisito necesario para la división celular.

En nuestro trabajo nos proponemos aportar datos que puedan ayudar a la clarificación de las posibles relaciones entre la replicación y la división. Como hipótesis de trabajo postulamos que el término de la ronda de replicación es un requisito ineludible para que se pueda producir la división celular.

Como material de trabajo hemos elegido la bacteria Escherichia coli dado el gran nivel de conocimientos que de ella se tiene. El trabajo se ha realizado con dos mutantes termosensibles de división, las estirpes D-2 y D-3. Dichas estirpes se obtuvieron por transducción a la estirpe OV-2 de las mutaciones termosensibles presentes en las cepas MAC-2 y MAC-3. Un estudio genético posterior mostró que dichas mutaciones lo son en el gen ftsA.

El abordaje científico se realizó a niveles fisiológicos y genéticos. Primeramente se estudiaron las estirpes a un nivel genético seguido de su caracterización fisiológica. Posteriormente se estudiaron las relaciones existentes entre la proteína FtsA y la proteína de terminación. Finalmente se estudió la relación entre síntesis de DNA y división bacteriana.

M A T E R I A L E S

## 2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

### 2.1.1 Material bacteriológico

Las distintas estirpes bacterianas de Escherichia coli utilizadas en la realización de este trabajo se detallan en la Tabla II. Proponemos que la mutación divA, descrita originalmente en la estirpe MAC-1 por de Pedro et al (32), se denomine ftsA-3. Asimismo, proponemos que la mutación divB, descrita originalmente por Llamas (108) en la estirpe MAC-2, se denomine ftsA-2

Tabla II Estirpes K-12 utilizadas en la realización de este trabajo

Estirpe	Genotipo/Fenotipo	Procedencia
MB-188	F <sup>-</sup> <u>ara</u> (Am), <u>lac 125</u> (Am), <u>gal U42</u> quinasa (Am), <u>gal</u> epimerasa, <u>trp</u> (Am), <u>supF</u> (A81Ts)	(160)
MC-6	F <sup>-</sup> <u>thi</u> , <u>thr</u> , <u>leu</u> , <u>pro C</u> , <u>thy A</u> , <u>deo B</u> , <u>deo C</u>	(32)
MAC-1	Como MC-6 y además <u>ftsA-3</u> (Ts)	(32)
MAC-3	Como MAC-1 y además <u>leu</u> <sup>+</sup>	(30)
MAC-2	Como MC-6 y además <u>ftsA-2</u> (Ts)	(108)
OV-2	Como MB-188 y además <u>ilv</u> , <u>his</u> , <u>leu</u> , <u>thy A</u> (deo), <u>tsx</u> (Am)	(39)
D-3	Como OV-2 y además <u>ftsA-3</u> (Ts), <u>leu</u> <sup>+</sup>	Esta Tesis
D-2	Como OV-2 y además <u>ftsA-2</u> (Ts), <u>leu</u> <sup>+</sup>	Esta Tesis
E-486	F <sup>-</sup> <u>thi</u> , <u>thr</u> , <u>leu</u> , <u>met</u> , <u>thy</u> , <u>lac</u> , <u>ton A</u> <u>str A</u> , <u>dna E</u> (Ts)	(182)
CT-284	F <sup>-</sup> <u>bio</u> , <u>pro</u> , <u>leu</u> , <u>thr</u> , <u>arg</u> , <u>thy</u> , <u>ara</u> <u>lac</u> , <u>man</u> , <u>xyl</u> , <u>dna C-28</u> (Ts)	(155, 202)

### 2.1.2 Material virológico

El bacteriófago P1 Kc se utilizó como vector en la transducción de los genes ftsA-3 y ftsA-2, presentes en las estirpes MAC-3 y MAC-2 respectivamente, a la estirpe OV-2. Este fago transduce cualquier marcado del cromosoma de E. coli con una frecuencia aproximada de  $10^{-5}$  transductantes/unidad formadora de placa.

Los análisis de complementación se realizaron con los bacteriófagos  $\lambda$  16-2 y  $\lambda$  16-4, obtenidos por Lutkenhaus y Donachie (104). Para distinguir estirpes lisogénicas de estirpes resistentes a  $\lambda$  se empleó el fago  $\lambda$  vir. El fago  $\lambda$  b2 red de Kaiser y Masuda (81) se utilizó para el desplazamiento del profago de las cepas lisogénicas.

Las distintas estirpes de fagos utilizadas en este trabajo se resumen en la Tabla III.

Tabla III Estirpes de bacteriófagos utilizadas en la realización de este trabajo.

Estirpe	Genotipo/Fenotipo	Genes bacterianos en el cromosoma del fago	Procedencia
P1 Kc			(118)
$\lambda$ 16-2	$\lambda$ 540	<u>envA</u> <sup>+</sup> , <u>ftsA</u> <sup>+</sup> , <u>ddl</u> <sup>+</sup> <u>murC</u> <sup>+</sup>	(104)
$\lambda$ 16-4	$\lambda$ 540	<u>envA</u> <sup>+</sup> , <u>ftsA</u> (Ts), <u>ddl</u> <sup>+</sup> , <u>murC</u> <sup>+</sup>	(104)
$\lambda$ vir	vir		M. Vicente
$\lambda$ b2 red	b2 red		(81)



## 2.2 MATERIAL QUIMICO

Como componentes de los medios de cultivo se han utilizado productos bacteriológicos o analíticos suministrados por las firmas Difco, Merck, Oxoid y Sigma Chemical Co.

Los inhibidores de síntesis de macromoléculas, cloramfenicol y ácido nalidíxico proceden de la firma Sigma Chemical Co. La rifampicina fue facilitada por los laboratorios Le Petit. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos utilizados fueron gentileza de la firma Antibióticos S.A.

Como precursores radiactivos de DNA se utilizaron  $[6-^3\text{H}]$ -timidina y  $[6-^3\text{H}]$ -timidina con una actividad específica original de  $5 \text{ Ci/mmole}$  y de  $1 \text{ Ci/mmole}$  respectivamente. Ambos productos proceden de Radiochemical Center, Amersham.

Como agente luminiscente se utilizó 2-(4-t butilfenil)-5-(4-bifenil)-1, 3, 4-oxadiazol (Butil PBD) de la firma CIBA.

### 2.3 EQUIPO INSTRUMENTAL

Los cultivos en medio sólido se incubaron en estufas termoestabilizadas marca Refritherm III o Elektro Helios.

Los cultivos en medio líquido se incubaron en baños termoestabilizados de agua con agitación circular marca Gyrotory Water Shaker modelo G 76 de la firma New Brunswick.

La recolección de células y obtención de cultivos síncronicos se realizaron en las centrifugas Wifug tipo X-1 y Sorvall RC2-B con rotor basculante HB4 respectivamente.

El número de partículas de un cultivo se midió utilizando un contador de partículas Coulter Counter modelo ZB1 con un orificio de entrada de 30  $\mu\text{m}$ .

Las distintas observaciones microscópicas se realizaron con un fotomicroscopio III de Zeiss con óptica de contraste de fase.

El aumento en masa de los cultivos en medio líquido se realizó con un espectrofotómetro Guilford N-305 Microsampler.

El conteo de muestras radioactivas se realizó en un contador de centelleo Intertechnique, modelo SL 32.

Se utilizaron, en fin, distinto tipo de equipo instrumental y material fungible de uso corriente en un laboratorio de microbiología.

24

## M E T O D O S

### 3.1 CONDICIONES DE ESTERILIZACION

Los medios de cultivo líquido se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión. Las soluciones madre de los cultivos definidos se esterilizaron por separado.

Los compuestos termolábiles se esterilizaron por filtración a través de membranas Millipore HAWP de 0.45  $\mu$ m de diámetro de poro. Tanto el Kitasato como las membranas habían sido esterilizadas previamente en autoclave.

Para la elaboración de medios sólidos de cultivo se esterilizaron por separado el medio líquido y el agar a una concentración doble de la final. Una vez esterilizados se mezclaron a partes iguales en condiciones estériles.

El material de vidrio se esterilizó en una estufa Pasteur a 180°C durante 6 horas.

Los distintos tipos de material termolabil (plásticos, filtros, etc.), se esterilizaron en autoclave según las condiciones descritas previamente.

La elaboración de los medios líquidos definidos, resuspensión de células, diluciones, etc., se realizaron frente a un mechero de gas Bunsen.

### 3.2 MEDIOS DE CULTIVO Y TAMPONES

#### 3.2.1 Medios de cultivo líquidos

- LBT<sub>20</sub>: Medio rico no definido descrito por Lennox (96) suplementado con timina hasta una concentración de 20 µg/ml. Su composición es la siguiente:

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	1 g
NaCl	1 g
Timina	20 mg
Agua destilada	hasta 1 l

- M9: Medio mineral definido descrito por Adams (2) suplementado con los requerimientos de la estirpe y con glucosa como fuente de carbono. Su composición es la siguiente:

Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H	6 g
KPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	3 g
NaCl	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	14.5 mg
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246 mg
Glucosa	4 g
Requerimientos	20 mg cada uno
H <sub>2</sub> O	Hasta 1 litro

Los requerimientos de las estirpes empleadas se detallan en la Tabla IV.

- M9R: Medio M9 enriquecido con casaaminoácidos y bases nitrogenadas (púricas y pirimidínicas). Su composición es la siguiente:

Medio M9	1 l
Casaaminoácidos	5 g

Adenina .....	20 mg
Citosina .....	20 mg
Uracilo .....	20 mg

Otros medios utilizados fueron simples variaciones de los medios M9 y M9R, tales como la sustitución de la glucosa por glicerol como fuente de carbono, la adición de aminoácidos no requeridos por la estirpe, la variación en la concentración de casa aminoácidos, etc. En cada caso se detallará la composición de dichos medios.

Todos los medios líquidos utilizados fueron filtrados previamente a su esterilización a través de membranas Millipore de 0.45  $\mu$ m de diámetro.

Tabla IV Requerimientos de las estirpes empleadas. El signo + indica la necesidad del requerimiento por presentar la estirpe dicha auxotrofia a 30°C y/o 42°C.

Estirpe	thy	thi	arg	his	ile	leu	met	pro	thr	trp	val
MB-188	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MC-6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
MAC-1	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
MAC-3	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
MAC-2	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
OV-2	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
D-3	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
D-2	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
CT-284	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
E-486	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-

## - Tampón fosfato:

- $\text{NaPO}_4\text{H}_2$ .....	61.2 g
- $\text{K}_2\text{PO}_4\text{H}$ .....	66.15 g
- $\text{H}_2\text{O}$ .....	Hasta 1 litro

## - Tampón para fagos:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ .....	17.65 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	3 g
- $\text{NaCl}$ .....	5 g
- $\text{MgSO}_4$ .....	120 g
- $\text{CaCl}_2$ .....	11.1 mg
- Solución de Gelatina al 1% .....	1 ml
- $\text{H}_2\text{O}$ .....	Hasta 1 litro

3.2.2 Medios sólidos de cultivo

Como medios de cultivo sólidos se utilizaron los medios descritos en el apartado 2.1 solidificados por adición de Bacto-Agar al 1.5% (P/V) o bien, cuando se especifique, al 0.75% (P/V) (Medio blando).

Para la comprobación de las distintas auxotrofías de las estirpes utilizadas, así como para medios selectivos, se utilizaron medios sólidos M9 deficientes en uno de los requerimientos de la estirpe.

Para la realización de lisados en placa se utilizó el medio BBL solidificado por adición de Bacto-Agar a las concentraciones anteriormente descritas. Su composición es la siguiente:

- $\text{NaCl}$ .....	5 g
- BBL triptona .....	10 g
- $\text{H}_2\text{O}$ .....	Hasta 1 litro

### 3.3 CONSERVACION DE LAS ESTIRPES

#### 3.3.1 Conservación de las estirpes bacterianas

Las distintas estirpes utilizadas se conservaron de manera rutinaria sobre medio LBT<sub>20</sub> sólido en placas Petri a 4°C aproximadamente. En estas condiciones, la viabilidad de las colonias permanece constante durante un mínimo de 20 días. La renovación de dichos cultivos se efectuaba de una manera periódica cada 15 días.

Para la conservación a más largo plazo de las distintas estirpes bacterianas se resuspendió un cultivo crecido en LBT<sub>20</sub> sólido en 3 ml de LBT<sub>20</sub> con glicerol al 20%. Dicho resuspendido se congeló y se mantuvo a -20°C en viales de 5 ml de capacidad. En estas condiciones conviene hacer la renovación de los cultivos cada tres años aproximadamente.

#### 3.3.2 Comprobación de marcadores

La comprobación de marcadores de las estirpes bacterianas se realizó sembrando dichas estirpes en medio sólido M9 así como en distintos medios sólidos M9 en los que cada uno era defectivo en uno de los requerimientos de la estirpe. Después de la incubación aparecerá crecimiento solo en aquellos medios que contengan todos los requerimientos de la estirpe.

#### 3.3.3 Conservación de las estirpes de fagos

Las distintas estirpes se conservaron a 4°C en tubos de vidrio conteniendo 10 ml de lisado y unas gotas de cloroformo. En estas condiciones el título se mantiene durante unos 4 meses (según el fago) a partir de los cuales decae, siendo, por tanto, conveniente realizar un nuevo lisado llegado este momento.



### 3.4 CONDICIONES DE CULTIVO

#### 3.4.1 Cultivos en medio líquido

Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces cuya capacidad fuese, al menos, cinco veces superior al volumen del cultivo. De esta manera se permite una buena aireación durante su agitación.

Para la obtención de cultivos exponenciales se procedió de la siguiente manera: se inoculó una colonia aislada en medio sólido en 20 ml del medio a utilizar. A continuación se incubó en un baño de agua termoestatizado con agitación durante unas 15 horas a 200 rpm. A partir de este cultivo se inocularon  $4 \times 10^6$  células/ml en medio estéril precalentado, incubándose a continuación en las mismas condiciones descritas. Al alcanzar el cultivo una densidad celular de  $4 \times 10^7$  cels/ml se diluyó 4 veces con medio estéril precalentado. Se continuó la incubación de este último cultivo, midiéndose el aumento en masa total y en número de células. Si ambos parámetros aumentaban de una forma exponencial y con la misma velocidad se continuaba la incubación hasta alcanzar la concentración celular deseada para el comienzo del experimento (normalmente  $3 \times 10^7$  células/ml).

#### 3.4.2 Cultivos en medio sólido

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas Petri de 10 cm de diámetro conteniendo de 25 a 30 ml de medio. La extensión del inóculo se realizó con asa de siembra si dicho inóculo procedía de un cultivo congelado o de un cultivo en medio sólido. Si el cultivo procedía de medio líquido, se tomó un inóculo de 0.2 ml que tras dilución en Medio-blando, previamente fundido y a 45°C, se vertió sobre el medio sólido de la placa.

Una vez realizada la extensión se incubaron los medios sólidos a 30°C ó 42°C en estufas durante un tiempo suficiente para la aparición de colonias.

### 3.5 MEDIDA DE PARAMETROS CELULARES

#### 3.5.1 Medida de la concentración celular

Para la determinación del número de células de un cultivo se tomaron muestras de 0.5 ml que se diluyeron a la mitad con 0.5 ml de una solución de formaldehído al 0.8% (P/V) y NaCl al 1.8% (p/v). Esta muestra puede mantenerse sin alteraciones durante un mínimo de 15 días a 4°C. Para el conteo de las partículas de la muestra fijada se utilizó un contador electrónico de partículas Coulter-Counter con una apertura de 30  $\mu$ m de diámetro. La muestra se diluyó en una solución de NaCl al 0.9% (P/V) que había sido filtrada previamente a través de una membrana Millipore de 0.22  $\mu$ m de tamaño de poro. Esta solución se empleó como electrolito. La dilución realizada se calculó de manera que el error por coincidencia fuera menor del 2%.

En las condiciones, el número de partículas de una muestra (medido por el contador de partículas) coincide normalmente con el número de células (medido por observación microscópica en una cámara de Petroff-Hauser).

#### 3.5.2 Medida de la masa

La determinación de la masa de un cultivo se realizó por turbidimetría. Para ello se tomaron muestras de 2 ml del cultivo a determinar, midiéndose la absorbancia (densidad óptica) a 450 nm en un espectrofotómetro Guilford. La absorbancia que presenta una muestra de un cultivo es proporcional a la masa y al contenido en proteínas de dicho cultivo.

#### 3.5.3 Medida del número de viables

El número de viables de un cultivo se calculó por el número de colonias aparecidas en un cultivo en medio LBT<sub>20</sub>-sólido a la temperatura permisiva. Para ello se tomaron muestras de 0.2

ml de una muestra, previamente diluida en tampón fosfato 50 mM pH 6.8, que tras mezclarlas con 2.5 ml de agar-blando a 45°C se extendieron en placas con LBT<sub>20</sub>-sólido, incubándose a continuación en estufas a 30°C hasta la aparición de colonias bien definidas. Las diluciones se realizaron para que en las placas apareciesen de 50 a 400 colonias.

### 3.5.4 Medidas radiométricas

#### 3.5.4.1 Técnicas generales

Como marcador específico de DNA se utilizó [6-<sup>3</sup>H]-timina (2.5 mCi/μg; 4 g/ml) o bien [6-<sup>3</sup>H]-timidina (194 mCi/mg; 5.2 μg/ml).

El proceso para medir la incorporación a células fue el siguiente:

- Se tomaron muestras de 0.1 ml del cultivo que se depositaron sobre filtros Wathman 3MM.
- Tras la absorción de la muestra se lavaron los filtros 3 veces; las 2 primeras con tricloroacético al 10% a 4°C durante 10 minutos y la tercera con tricloroacético al 5% a 4°C durante 10 minutos.
- Después de los 3 lavados anteriores, se volvieron a lavar 2 veces con etanol absoluto a 4°C. La primera vez durante unas 15 horas y la segunda durante 10 minutos.
- Después de los lavados con etanol, se secaron los filtros en una estufa a 80°C durante 30 minutos aproximadamente.
- Una vez secos los filtros, se introdujeron en vialitos de 2.5 ml de capacidad con butil-PBD al 0.5% (P/V) en tolueno como medio centelleante. Los vialitos se introdujeron en viales normalizados para el conteo.
- El conteo se realizó en un contador de centelleo Intertech-nique, modelo SL-32.

#### 3.5.4.2 Tipos de marcado

#### 3.5.4.2.1 Células uniformemente marcadas

Para la obtención de poblaciones cuyas células presenten su DNA uniformemente marcado, se incubaron los cultivos a 30°C en presencia del precursor radioactivo,  $^3\text{H}$ -timina, durante un mínimo de 5 generaciones antes del comienzo del experimento. En estas condiciones, el 94% de las células presentan su DNA uniformemente marcado.

#### 3.5.4.2.2 Pulsos de timidina

La velocidad de replicación del DNA se midió mediante pulsos de  $^3\text{H}$ -timidina. A muestras de 0.5 ml del cultivo se les añadió 10  $\mu\text{l}$  de  $^3\text{H}$ -timidina incubándose a continuación durante 5 minutos. Al término del pulso se tomó 0.1 ml de la muestra, procediéndose como se ha dicho anteriormente.

#### 3.5.5 Observación fotomicroscópica

La observación microscópica así como la toma de fotografías se realizaron con un fotomicroscopio Zeiss III con óptica de contraste de fase.

Para fotografiar las células se extendieron pequeñas muestras de un cultivo, fijado o no, sobre portas recubiertos de una delgada lámina de agar al 1.5% (p/v) y azida sódica al 0.1%.

Para la visualización de nucleoides el recubrimiento de los portas era de agar nutritivo al 1.5% (Nutrient Broth n°2 de Oxoid) con 200  $\mu\text{g/ml}$  de cloramfenicol para condensar el DNA (200) y polivinilpirrolidona (PVP-10) al 23% que al incrementar el índice de refracción del medio aumenta el contraste entre los nucleoides y el citoplasma.

Para la observación y fotografía de los procesos de separación in vivo se utilizó agar nutritivo al 1.5%. En ciertos casos se añadió cloramfenicol (200  $\mu\text{g/ml}$ ) al agar nutritivo.

### 3.6 OBTENCION DE POBLACIONES SINCRONICAS

La obtención de poblaciones sincrónicas se realizó según la técnica descrita por Mitchison and Vincent (122). Este método consiste en la selección de las células más pequeñas de un cultivo exponencial tras ser sometido a una centrifugación en gradiente de sacarosa. Dicho gradiente cumple dos funciones: Por una parte funciona como soporte en el que se depositan las células del cultivo exponencial y por otra estabiliza la columna de líquido durante la centrifugación. El fundamento de este método es la mayor rapidez de sedimentación de las partículas de mayor volumen del cultivo, no siendo, en ningún modo, un gradiente de equilibrio ya que la mayor densidad del gradiente ( $\sim 1.06$  g/ml) es inferior a la densidad celular de E. coli que, según determinaron Koch y Blumberg (85) es de 1.13 g/ml. Este método, junto a la selección por elución de membrana (selección de células recién nacidas) descrita por Helmstetter (56) y Helmstetter and Cummings (59), es el más fisiológico de los descritos hasta el momento. La técnica de centrifugación en gradiente de sacarosa presenta una serie de ventajas respecto a la técnica de selección por elución de membrana: Por una parte se obtiene un mayor rendimiento celular (entre 10 y 100 veces superior) que además de posibilitar la observación microscópica, reduce el error en la determinación del número de partículas. Por otra parte este método es más sencillo y rápido respecto al método de Helmstetter (56, 59) en la obtención de poblaciones sincrónicas.

Los gradientes lineales de sacarosa utilizados fueron del 6% al 14% en LBT<sub>20</sub>. Se realizaron mediante un sistema consistente en dos cubetas comunicadas por su base, de las que una de ellas presenta un orificio de salida por el que eluye gradualmente el medio. A la cubeta con orificio de salida se le añadió 5 ml de LBT<sub>20</sub> con sacarosa al 14% (P/V) mientras que a la otra se le añadió un volumen igual de LBT<sub>20</sub> con sacarosa al 6% (P/V).

El método seguido para la obtención de poblaciones sin-

crónicas fué el siguiente:

- 1°) Crecimiento exponencial de una población hasta alcanzar una densidad celular de aproximadamente  $10^8$  células/ml.
- 2°) Centrifugación de 200 ml de dicho cultivo a 3300 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 3°) Resuspensión del sedimento en 1 ml de medio.
- 4°) Depósito de dicha resuspensión sobre el gradiente de sacarosa.
- 5°) Agitación suave en la parte superior del gradiente para romper la interfase entre la suspensión celular y el gradiente.
- 6°) Centrifugación del gradiente en un rotor basculante durante 2 minutos 30 segundos a 4000 g a temperatura ambiente.
- 7°) Toma de 0.2 ml de la zona superior turbia mediante una jeringa.
- 8°) Resuspensión de los 0.2 ml en medio fresco precalentado (aproximadamente 30 ml). El rendimiento celular es aproximadamente del 1%.

### 3.7 EMPLEO DE INHIBIDORES Y ANTIBIOTICOS

#### 3.7.1 Inhibición de la síntesis de DNA

Como inhibición reversible de la síntesis de DNA se realizó un ayuno de timina en aquellas estirpes thy. Sin embargo, tal como se comentará en la sección de Resultados, las células en las condiciones utilizadas, presentan un contenido interno de timina que posibilita un cierto grado de replicación, no siendo, por tanto, este método adecuado para aquellos experimentos que requieran una inhibición inmediata. En los mutantes dna se utilizó como inhibidor reversible la transferencia del cultivo a la temperatura restrictiva.

Como inhibidor no reversible de la síntesis de DNA se utilizó ácido nalidíxico a una concentración de 80 µg/ml (48). A dicha concentración la inhibición es inmediata, no siéndolo a concentraciones inferiores.

Se preparó el mismo día de su utilización una solución de ácido nalidíxico a una concentración de 2 mg/ml en NaOH 0.05 N a partir de la cual se añadió al cultivo hasta una concentración final de 80 µg/ml.

Otro inhibidor no reversible de la síntesis de DNA utilizado fue la hidroxiurea (173) a una concentración de 15 mg/ml. Como el resto de los inhibidores utilizados en este trabajo se preparó la solución madre el mismo día de su utilización (a una concentración, en este caso, de 60 mg/ml en LBT<sub>20</sub>).

#### 3.7.2 Inhibición de la síntesis de RNA

Como inhibidor de la síntesis de RNA se utilizó rifampicina a una concentración final de 500 µg/ml. A dicha concentración la inhibición de la síntesis de proteínas es casi inmediata.

En el día de su utilización se preparó una disolución de rifampicina a una concentración de 25 mg/ml en etanol. A partir de esta disolución se preparó otra nueva a una concentración de 2 mg/ml en LBT<sub>20</sub>. De esta nueva disolución se añadió un cierto volumen al medio de cultivo de forma que la concentración final fuese de 500 µg/ml.

### 3.7.3 Inhibición de la síntesis de proteínas

Como inhibidor reversible de la síntesis de proteínas se realizó un ayuno de todos los aminoácidos en estirpes que requiriesen alguno. En estas condiciones el aumento en masa del cultivo se detiene inmediatamente y por tanto, la síntesis de proteínas.

Como inhibidor no reversible de la síntesis de proteínas se utilizó cloramfenicol a una concentración de 200 µg/ml.

La solución madre se preparó, al igual que el resto de los inhibidores, el mismo día de su utilización a una concentración de 2 mg/ml en H<sub>2</sub>O destilada.

### 3.7.4 Inhibición de la división

La inhibición de la división celular se realizó por tratamiento térmico en los distintos mutantes ftsA, como es obvio. Como temperatura permisiva, es decir aquella temperatura en la que no se manifiesta aparentemente el fenotipo mutante, se utilizó la de 30°C. Como temperatura restrictiva, es decir aquella en la que la división queda inhibida, se utilizó la de 42°C. La transferencia de 30°C a 42°C, o viceversa, se realizó por simple transferencia de una a otra temperatura, ya que al utilizar volúmenes pequeños el cambio de temperatura del cultivo, se adquiría casi de inmediato.



### 3.7.5 Empleo de antibióticos -lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos fueron disueltos, en el día de su utilización, en LBT<sub>20</sub> a las siguientes concentraciones:

Cefaloridina .....	240 $\mu\text{g/ml}$
Cefalexina .....	600 $\mu\text{g/ml}$
Bencil Penicilina .....	2400 $\mu\text{g/ml}$
Ampicilina .....	120 $\mu\text{g/ml}$
Mecillinam .....	19.14 $\mu\text{g/ml}$
Ac. 6 Amino Penicilánico .....	3840 $\mu\text{g/ml}$

### 3.8 ALINEAMIENTO CROMOSOMICO

El tratamiento que se detalla a continuación ocasiona una sincronización en la síntesis de DNA de forma que todas las células de la población inician simultáneamente, al término de dicho tratamiento, una ronda de replicación. Este tipo de tratamiento se ha utilizado repetidamente por distintos laboratorios siendo ya un método clásico para el alineamiento cromosómico. Para la realización de este trabajo nos basamos en el descrito por Hanawalt y Wax (55) y por Jones and Donachie (80). El fundamento teórico se comentará en el capítulo de Resultados.

El tratamiento realizado fue el siguiente:

- 1º) Crecimiento exponencial de un cultivo en M9R líquido.
- 2º) Inhibición de la síntesis de proteínas, por medio de un ayuno de aminoácidos, durante un tiempo ligeramente superior a un tiempo de generación. El ayuno de aminoácidos se realizó por filtración del cultivo exponencial a través de una membrana Millipore de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro seguido de dos lavados con un volumen igual al filtrado de M9R menos aminoácidos, fresco y precalentado, resuspendiendo a continuación las células adheridas a la membrana en medio M9R menos aminoácidos fresco y precalentado. El proceso de eliminación de aminoácidos del medio de cultivo no duró más de 3-4 minutos.
- 3º) Inhibición de la síntesis de DNA y desinhibición de la síntesis de proteínas durante un tiempo igual a dos tiempos de generación.  
Este proceso se realizó de una forma similar al descrito en el apartado 2, diferenciándose en que el medio de lavado y el medio de resuspensión era M9R menos timina.
- 4º) Después de los dos períodos de inhibición descritos, adición de timina al medio hasta una concentración de 20  $\mu$ g/ml. En este momento todas las células del cultivo comienzan una ronda de replicación sincrónicamente.

### 3.9 METODOS VIROLOGICOS

#### 3.9.1 Obtención de lisados del fago P1KC

Para la obtención de lisados de P1KC se siguió el método utilizado por Masters (118) que se detalla a continuación:

- 1°) Crecimiento de la estirpe donadora en LBT<sub>20</sub> mas CaCl<sub>2</sub> (5mM) a 30°C con agitación hasta una D.O<sub>450</sub> de aproximadamente 0.4 U.A. (aproximadamente 10<sup>8</sup> cel/ml).
- 2°) Adición del fago a 10 ml del cultivo anterior hasta una multiplicidad de infección de 1 u.f.p./célula.
- 3°) Adición de glucosa hasta una concentración de 0.2% (P/V) y de MgSO<sub>4</sub> hasta 5 mM en el momento de la adición del fago.
- 4°) Incubación a 30°C con agitación hasta que se produzca la lisis del cultivo bacteriano, observable por la pérdida significativa de turbidez que acontece. Este período tiene una duración de 2 horas 30 minutos, aproximadamente.
- 5°) Adición de 2 ml de cloroformo e incubación a 30°C con agitación durante 10 minutos .
- 6°) Centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 4°C.
- 7°) Adición de 2 ml de cloroformo al sobrenadante.
- 8°) Conservación del lisado a 4°C.

#### 3.9.2 Titulación de los lisados

Para la titulación (n° u.f.p./ml) de los lisados se procedió de la siguiente manera:

- 1°) Crecimiento de la estirpe bacteriana marcadora en LBT<sub>20</sub> a 30°C con agitación hasta una D.O. = 1.0 U.A.
- 2°) Adición a tubos conteniendo 2.5 ml de BBL-blando licuado de 0.5 ml de cultivo bacteriano y de 0.1 ml de lisado a distintas diluciones (normalmente de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-8</sup>) en tampón para fagos.

- 3°) Tras ligera agitación de los tubos, vertido en placas BBL.
- 4°) Incubación a 30°C durante 15-20 horas.
- 5°) Recuento de las placas de lisis y cálculo del título.

#### 3.9.3 Transducción mediada por el bacteriófago P1KC

Se siguió el método utilizado por Masters (118) que se detalla a continuación:

- 1°) Crecimiento de la cepa receptora en 5 ml de LBT<sub>20</sub> mas Cl<sub>2</sub>Ca (5 mM) a 30°C hasta una D.O. de 2.0 U.A. (aproximadamente 10<sup>9</sup> células/ml).  
450
- 2°) Centrifugación del cultivo durante 10 minutos a 2500 g a temperatura ambiente.
- 3°) Resuspensión del sedimento en 0.5 ml de LBT<sub>20</sub> mas CaCl<sub>2</sub> (5mM)
- 4°) Mezcla de 0.2 ml del resuspendido con 0.2 ml del lisado transductor diluido a un título de  $2 \times 10^8$  ufp/ml. La multiplicidad de infección, en estas condiciones, es de 1/50 ufp/bacteria.
- 5°) Incubación a 30°C sin agitación durante 20 minutos.
- 6°) Adición a la mezcla de 1.0 ml de tampón para fagos.
- 7°) Siembra de 0.1 ml en placas selectivas. Simultáneamente se sembraron placas control para analizar la reversión de los marcadores que se fueran a seleccionar y de la ausencia de bacterias contaminantes en el lisado. Las placas se incubaron a 30°C durante el tiempo necesario para la aparición de colonias.
- 8°) Análisis de las colonias aparecidas en medios selectivos.

#### 3.9.4 Lisogenización por el fago $\lambda$

Para lisogenizar distintas estirpes de E. coli K12 por determinadas estirpes del fago  $\lambda$  se procedió del siguiente modo:

- 1°) Adición de 0.2 ml de un cultivo estacionario de E. coli crecido en LBT<sub>20</sub> a 30°C a 2.5 ml de BBL-blando licuado.
- 2°) Vertido de la mezcla anterior en placas de BBL.
- 3°) Adición de una pequeña gota del fago con título superior a 10<sup>5</sup> ufp/ml.
- 4°) Incubación a 30°C durante 15 horas aproximadamente.
- 5°) A partir de la zona con crecimiento residual presente en los halos de lisis de las placas, aislamiento de colonias en placas de LBT<sub>20</sub>.
- 6°) Las colonias obtenidas de esta manera son en un alto porcentaje lisógenas para  $\lambda$ .

#### 3.9.5 Prueba de lisogenia

Para la comprobación de la lisogenia de las colonias obtenidas según el método anterior se procedió de la siguiente manera:

- 1°) Crecimiento de las colonias presuntamente lisógenas en LBT<sub>20</sub> a 30°C durante 15 horas.
- 2°) Adición de 2.5 ml de BBL-blando licuado a 0.2 ml del cultivo anterior.
- 3°) Vertido y solidificación de la mezcla anterior en placas de BBL.
- 4°) Adición de una pequeña gota del fago  $\lambda$  vir y del fago  $\lambda$  presuntamente lisogenizante.
- 5°) Incubación a 30°C durante 15 horas.
- 6°) Análisis de las placas obtenidas según la Tabla V:

Tabla V Análisis de lisogenia

	Lisado del mismo $\lambda$ que posiblemente esté integrado como profago	$\lambda$ <u>vir</u>	Interpretación
Presencia de Halos de Lisis	+	+	Bacteria No Lisogenizada
	-	-	Bacteria $\lambda$ Resistente
	-	+	Bacteria Lisogenizada

61

## RESULTADOS

#### 4.1 ANALISIS DE LOS MUTANTES TERMOSENSIBLES DE DIVISION D-2 y D-3.

##### 4.1.1 Efecto del cloramfenicol sobre filamentos de las estirpes MAC-1 y MAC-3

Tal como se expuso en la Introducción nuestro interés era el estudio de las posibles relaciones entre el término de la ronda de replicación del cromosoma bacteriano y la división celular. El comportamiento de las estirpes MAC-1 y MAC-3 (30, 31, 32, 176) llevó a postular que en ellos el control temporal de la división estaba alterado. Los resultados sugerían que la acción del producto del gen mutado, es decir ftsA, finalizaba 20 minutos antes de la división, es decir, al término del período C y comienzo del período D. Por otra parte, la duración de su período de acción debería comenzar sincrónicamente con el comienzo de la replicación. La mutación termosensible de división descrita en MAC-1 fue denominada divA (Ts) y al alelo salvaje divA<sup>+</sup>. Resultados posteriores (este trabajo) demostraron que divA (Ts) es una forma alélica del gen ftsA. El alelo presente en MAC-1 y MAC-3 fue cambiado en su denominación de divA (Ts) a ftsA-3. En este trabajo se utilizará el nombre más reciente, es decir ftsA-3.

Resultados de Llamas (108) sugerían que el mutante termosensible de división MAC-2 estaba afectado en el período D. Es decir, desde el término de la ronda de replicación hasta la separación física de las células. También observó que la acción del producto del gen mutado de la estirpe MAC-2 presentaba un carácter termorreversible. La mutación termosensible presente en MAC-2 se denominó divB (Ts). Resultados posteriores (ver apartado 1.2 de este capítulo) demostraron que dicha mutación es también una forma alélica del gen ftsA. El alelo divB (Ts) pasa a ser denominado ftsA-2.

Los resultados mencionados fueron obtenidos en cultivos sincronizados por el método de elución de membrana (56, 59) modi-



ficado por de Pedro (30). Este tipo de cultivos presentan un rendimiento celular relativamente bajo, del orden de  $10^5$  células/ml lo que imposibilita el conteo del número de partículas mediante microscopía así como la evolución del incremento en D.O. durante el curso de la experimentación.

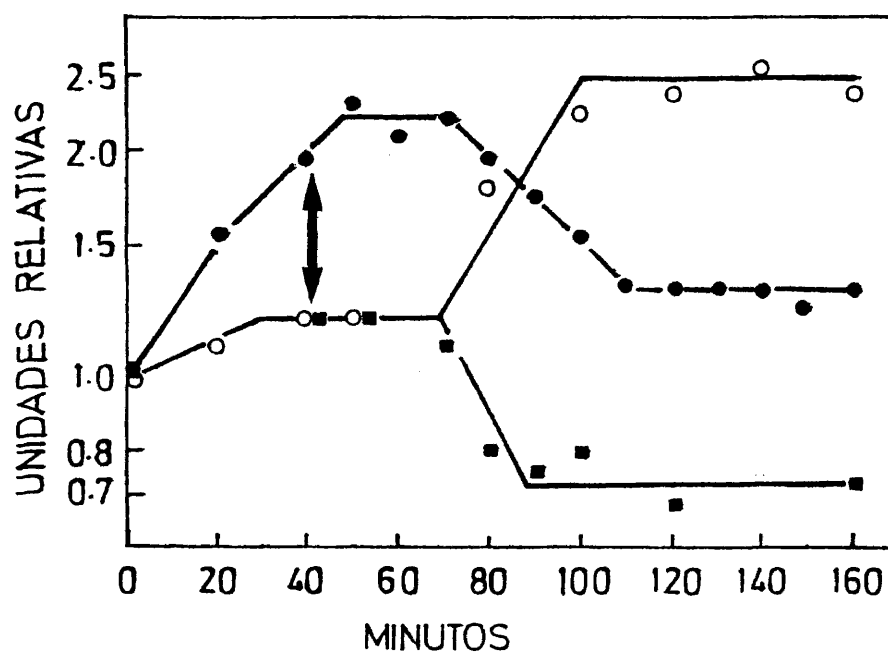
Para evitar estos problemas realizamos diversos experimentos de control con MAC-3 y MAC-1 en fase de crecimiento exponencial. Los resultados obtenidos mostraron que ambas estirpes presentaban una lisis generalizada tras tratamiento a la temperatura restrictiva y con diversas drogas, tales como cloramfenicol y Mecillinam. En efecto, tal como podemos observar en la Figura 1, si se inhibe la síntesis de proteínas a un cultivo de MAC-1 preincubado a la temperatura restrictiva durante cuarenta minutos ocurre un proceso de lisis celular en los filamentos del mutante.

Este proceso de lisis queda reflejado en una disminución en el número de células y en la masa total del cultivo junto con un aumento simultáneo en el número de partículas. Este último parámetro representará la suma del número de células y de partículas de lisis.

Estos y otros resultados junto a los obtenidos por Fenoll (44) indican una fuerte tendencia de los mutantes de división a lisar cuando su fondo genético es la estirpe MC6. Interesa por tanto estudiar estas mutaciones en otra estirpe cuyo genotipo no provoque lisis inespecífica de las células. Por otra parte, el interés de comparar las mutaciones ftsA-2 y ftsA-3 con la ya descrita ftsA-16 (38) nos indujo a transducir las mutaciones termosensibles de división presentes en MAC-3 y MAC-2 a la estirpe OV-2 (39).

#### 4.1.2 Transducción de las mutaciones ftsA-2 y ftsA-3: Obtención de las estirpes D-2 y D-3

La transducción se realizó tal como se describe en el



**Figura 1** ACCION DEL CLORAMFENICOL SOBRE FILAMENTOS DE MAC-1

Un cultivo de MAC-1 en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C se transfirió a 42°C en el minuto 0. 40 minutos después (momento indicado por una flecha) se añadió CM al medio de cultivo. Durante todo el proceso se siguió la cinética de aumento en partículas (○), células (■) y D.O. (●)<sub>450</sub>. Los valores iniciales fueron de  $8.3 \times 10^6$  part/ml,  $6.8 \times 10^6$  cel/ml y 0.09 U.A.

apartado 3.9.3 del capítulo de Métodos. Resultados de Pedro et al., (32) y de Llamas (108) indican que ambas mutaciones son cotrasducibles con leu.

Para la transducción de ftsA-3 se utilizó MAC-3 (derivado leu<sup>+</sup> de MAC-1) como cepa donadora y OV-2 como cepa receptora. La selección se realizó en placas de medio mínimo con todos los requerimientos de OV-2 excepto leucina. Se estudió el crecimiento en LBT<sub>20</sub> a 30 y 42°C de las colonias aparecidas tras incubación a 30°C. La frecuencia de cotransducción obtenida entre leu y ftsA-3 fue de 0.06. Aquellas colonias que crecían a 30°C pero no a 42°C fueron purificadas y comprobados sus marcadores, eligiéndose una colonia que presentaba crecimiento positivo a 30°C en LBT<sub>20</sub> y en medio mínimo con todos los requerimientos de OV-2 excepto leucina y que presentaba crecimiento negativo a 42°C en medio rico y a 30°C en medio mínimo deficiente en alguno de los requerimientos de OV-2 excepto leucina. A esta estirpe se la denominó D-3.

A partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial de D-3 se realizó un inóculo en medio LBT<sub>20</sub> sólido incubándose a continuación a 30 ó 42°C. Tras 24 horas a dichas temperaturas se contaron el número de colonias aparecidas a 30°C y a 42°C, calculándose la frecuencia de reversión del alelo ftsA-3 que presenta un valor de  $2.8 \times 10^{-8}$ .

Para la cotransducción de ftsA-2, mutación presente en MAC-2, a la cepa OV-2 hubo primeramente que obtener un derivado leu<sup>+</sup> de MAC-2. Este derivado se obtuvo por transducción del gen leu<sup>+</sup> de la cepa MB-188 a MAC-2, seleccionándose una colonia termosensible que presentase todos los marcadores de MAC-2 excepto leucina. A partir de este derivado se realizó una nueva transducción a la estirpe OV-2 de una manera similar a la realizada para la obtención de D-3. La estirpe así obtenida se denominó D-2.

La frecuencia de cotransducción entre leu<sup>+</sup> y ftsA en la transducción de la estirpe MB-188 a MAC-2 (alelo ftsA-2) fue de

0.56 y entre leu<sup>+</sup> y ftsA-2 en la transducción de la estirpe MAC-2 a OV-2 fue de 0.40. La frecuencia de cotransducción media fue, por tanto de 0.48. El gen leu está localizado en el minuto 1.6 del mapa genético de Escherichia coli (4). A partir de estos resultados y basándonos en la ecuación de Wu (195) podemos calcular el minuto en el que se encuentra localizado ftsA-2

$$f = (1 - \frac{d}{2})^3 \quad 8$$

siendo f la frecuencia de cotransducción y d la distancia en minutos entre los dos marcadores. Por tanto para ftsA-2 como f es igual 0.48 sustituyendo en la ecuación 8 se obtiene un valor de  $d = 0.44$  minutos. Es decir, la distancia entre los genes leu y ftsA-2 es de 0.44 minutos. Resultados de Llamas (108) mostraron que leu se encuentra localizado a la izquierda de ftsA-2. Como leu se encuentra en el minuto 1.6, ftsA-2 se encontrará localizado en el minuto 2.04 del mapa cromosómico de E. coli. El gen ftsA se encuentra en el minuto 2 (4). Por lo tanto estos resultados son coherentes con la hipótesis de que ftsA-2 (anteriormente divB (Ts)) sea un alelo de dicho gen.

La frecuencia de cotransducción obtenida en el caso de MAC-3 (6%) era mucho menor a la esperada si la mutación presente en dicha estirpe fuese alélica de ftsA. Sin embargo, los resultados aparecidos en la literatura muestran que la frecuencia de cotransducción entre dos marcadores pueden variar mucho. Así, Bachman et al., (5) observaron que la distancia thr-leu, calculada en base a las frecuencias de cotransducción ya obtenidas, pueden variar entre 0.83 y 2.14 minutos. Estos resultados, junto a la morfología de los filamentos de MAC-2 y MAC-3 (filamentos con unas ligeras constricciones o invaginaciones en los lugares donde presumiblemente deberían haberse formado los septos) que son característicos de los mutantes ftsA (180) nos llevaron a realizar pruebas de complementación con varios vectores del fago  $\lambda$  para poder determinar si las mutaciones presentes en MAC-1, MAC-3, D-2 y D-3 son alélicas del gen ftsA.

#### 4.1.3 Análisis de complementación: comprobación de que los alelos termosensibles de división presentes en las estirpes D-2 y D-3 son mutaciones del gen *ftsA*

Los análisis de complementación se realizaron por lisogenización de las estirpes MAC-1, MAC-3, D-2 y D-3 con un vector del fago  $\lambda$  portador del alelo *ftsA*<sup>+</sup> ( $\lambda$  16.2) y con otro vector que contiene el alelo termosensible *ftsA*-12 (Ts) ( $\lambda$  16-4) (104). Para que pueda saberse con certeza si son mutaciones del gen *ftsA* han de ser recesivas respecto al alelo salvaje. Fletcher *et al.*, observaron que el supuesto alelo *84ts* del gen *ftsA* tenía un carácter dominante sobre el alelo salvaje. Los análisis de complementación para saber con exactitud cual es el gen mutado en la estirpe en estudio son fundamentales, sobre todo si se trata de un mutante de división cuya lesión este localizada en los primeros minutos del mapa cromosómico ya que en esta zona hay un número elevado de genes que intervienen, de una manera u otra, en la división (107, 186).

La lisogenización de las distintas estirpes con los fagos anteriormente mencionados se hizo según el método ya descrito en el apartado 9.4 de Métodos. Los resultados se expresan en la Tabla VI. Tal como se puede observar todas las estirpes lisogenizadas por  $\lambda$  16-2 (es decir,  $\lambda$  portador del alelo *ftsA*<sup>+</sup>) pasaron a ser termo-resistentes. Esto indica que el alelo *ftsA*<sup>+</sup> complementa las mutaciones *ftsA*-2 y *ftsA*-3 presentes en MAC-1, MAC-3, D-3 y D-2. Al desplazar el profago  $\lambda$  16.2 de las estirpes lisógenas con  $\lambda$  b 2 *red*, según se describe en el capítulo de Métodos, se recobraba de nuevo el carácter termosensible de la estirpe. En el caso del cruce de MAC-1 con  $\lambda$  16.2, un 3% de las colonias termosensibles eran lisógenas. Este resultado parece estar en contradicción con los anteriores y querría decir que *ftsA* no complementa al 100% a *ftsA*-3 y *ftsA*-2. Al ser desplazado el vector  $\lambda$  16.2 de MAC-1, las colonias permanecían con su carácter termosensible. Lo que posiblemente pudo ocurrir fue que el vector que lisogenizó a estas colonias no llevase consigo el alelo *ftsA*<sup>+</sup>.

Tabla VI. Análisis de complementación de varios alelos ftsA

cruce	% t <sup>S</sup>	% lisógenos	% t <sup>R</sup>	% lisógenos
MAC-1 ( <u>ftsA-3</u> )- λ 16.2 ( <u>ftsA</u> <sup>+</sup> )	31	3	69	100
MAC-1 ( <u>ftsA-3</u> )- λ 16.4 ( <u>ftsA</u> )	100	10	0	0
MAC-3 ( <u>ftsA-3</u> )- λ 16.2 ( <u>ftsA</u> <sup>+</sup> )	75	0	25	100
MAC-3 ( <u>ftsA-3</u> )- λ 16.4 ( <u>ftsA</u> )	99	70	1	1
D-3 ( <u>ftsA-3</u> )- λ 16.2 ( <u>ftsA</u> <sup>+</sup> )	2	0	98	100
D-3 ( <u>ftsA-3</u> )- λ 16.4 ( <u>ftsA</u> )	100	70	0	0
D-2 ( <u>ftsA-2</u> )- λ 16.2 ( <u>ftsA</u> <sup>+</sup> )	68	0	32	100
D-2 ( <u>ftsA-2</u> )- λ 16.4 ( <u>ftsA</u> )	100	20	0	0

Lógicamente, todas las estirpes lisogenizadas por el vector λ 16.4 (es decir un vector λ con un alelo termosensible de ftsA) permanecían termosensibles, excepto una colonia de MAC-3 lisógeno para λ 16.4 que era termorresistente. Tras ser desplazado el profago de la bacteria, esta conservaba su carácter termorresistente. Ello parece sugerir que dicha estirpe provenía de un lisógeno re-vertiente para el gen estructural.

En resumen, los estudios de complementación indican que los genes denominados previamente div A y div B son alelos del gen ftsA. Dado que esta denominación es anterior, los alelos se llamaron ftsA-2 (presente en la estirpe D-2) y ftsA-3 (presente en la estirpe D-3).

#### 4.1.4 Efecto del cloranfenicol sobre filamentos de D-3

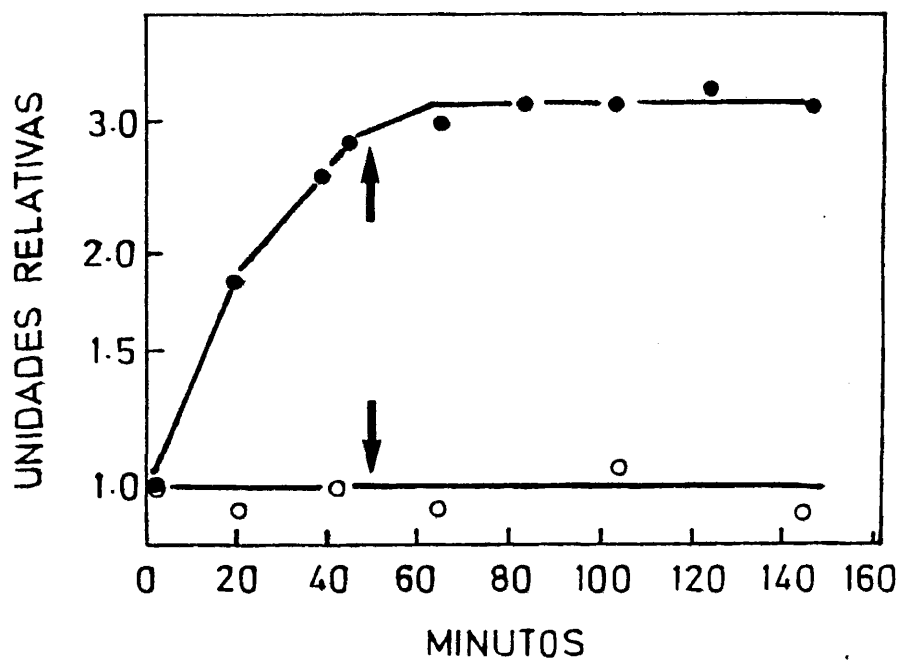
Una de las razones por las que se transdujeron las mutaciones ftsA-2 y ftsA-3 a la estirpe OV-2 fue el que estuvieran en una cepa que, a diferencia de los que ocurría en los mutantes MAC-1 y MAC-3, no presentara lisis inespecífica tras tratamientos tales como la inhibición de la síntesis de proteínas por acción del cloramfenicol.

Una vez obtenidos los mutantes D-2 y D-3 se realizaron una serie de pruebas control, similares a las hechas con MAC-2 y MAC-3, para poder determinar si bajo esas condiciones los mutantes de la estirpe OV-2 presentaban también tendencia a lisar.

Los resultados obtenidos indicaban una mayor resistencia de la cepa OV-2 a la lisis inespecífica. Como muestra, se puede observar en la figura 2 que D-3 no sufre lisis si se inhibe la síntesis de proteínas a un cultivo preincubado a la temperatura restrictiva durante 40 minutos (comparese con Fig. 1 en donde cultivos de MAC-3 sometidos a las mismas condiciones sufrían una lisis generalizada).

#### 4.1.5 Análisis fenotípico de las estirpes D-2 y D-3

La caracterización de D-3 como mutante termosensible de división se realizó mediante el estudio de diversos parámetros celulares tanto a la temperatura permisiva (30°C) como restrictiva (42°C). Se siguió el crecimiento en número de células (número de partículas), en viables, en masa (densidad óptica a 450 nm) y en DNA (incorporación de  $[6-^3\text{H}]$ -timina en un cultivo uniformemente marcado). Los resultados, que se muestran en la figura 3 indican que a 30°C el crecimiento es normal con un tiempo de generación de aproximadamente 40 minutos. Por el contrario, los cultivos incubados a 42°C cesan inmediatamente de dividirse, hecho que queda reflejado en la detención del aumento en el número de



**Figura 2** ACCION DEL CLORAMFENICOL SOBRE FILAMENTOS DE D-3

Un cultivo de D-3 en fase de crecimiento exponencial en  $LBT_{20}$  a  $30^{\circ}C$  fue transferido a  $42^{\circ}C$  en el minuto 0. 45 minutos después (momento indicado por una flecha) se añadió CM al medio de cultivo. Durante todo el proceso se siguió la cinética de aumento en partículas (○) y  $D.O._{450}$  (●). Los valores iniciales fueron de  $5.2 \times 10^7$  part/ml y 0.215 U.A.

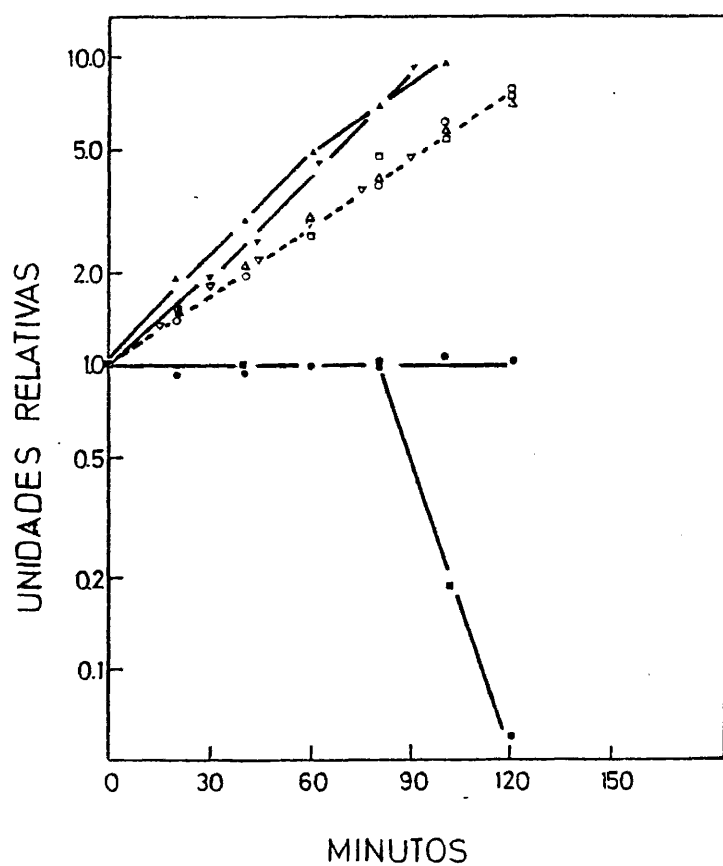


células, manteniéndose la viabilidad hasta unos 90 minutos después de la transferencia a la temperatura restrictiva. La masa y la cantidad total de DNA aumentan de una manera exponencial y a mayor velocidad que a 30°C. La observación microscópica (Fig. 4) muestra que las células incubadas a 42°C sufren una filamentación, manteniéndose constante el diámetro celular.

Puede observarse en los filamentos las dislocaciones características de los mutantes ftsA. La inmediata detención de la división celular junto a la ausencia de divisiones residuales parecen indicar que el producto del gen ftsA es necesario hasta el término de la división celular. Asimismo estos resultados indican que el paso a una forma inactiva de dicho producto, provocado por un aumento de temperatura, es inmediato. El mutante D-2, en experimentos similares (figuras 4 y 5) se comporta de una manera semejante a D-3, con la sola excepción de que la viabilidad de los filamentos se mantiene al menos hasta 120 minutos después de la transferencia a la temperatura restrictiva.

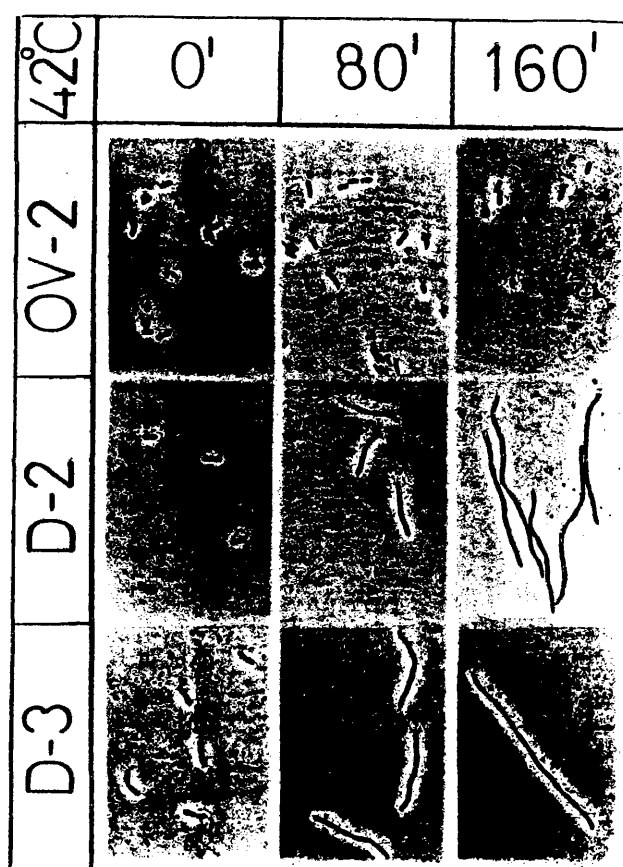
#### 4.1.6 Segregación de nucleoides a la temperatura restrictiva en las estirpes D-2 y D-3

Para comprobar que la mutación ftsA no afecta a la segregación de los nucleoides se procedió al estudio de dicha segregación en D-2 y D-3 a 42°C. De las figuras 3 y 4 se puede deducir que la cantidad de DNA por célula aumenta de una manera exponencial. Para poder determinar si la segregación de nucleoides estaba afectada a la temperatura restrictiva se procedió a la observación microscópica de los filamentos, formados tras 60 min de incubación a 42°C, de D-2 y de D-3 según el método detallado en el capítulo de Métodos, apartado 3.5.5. Los resultados que se muestran en la Fig. 6 indican que la segregación de nucleoides no parece estar afectada a la temperatura restrictiva.



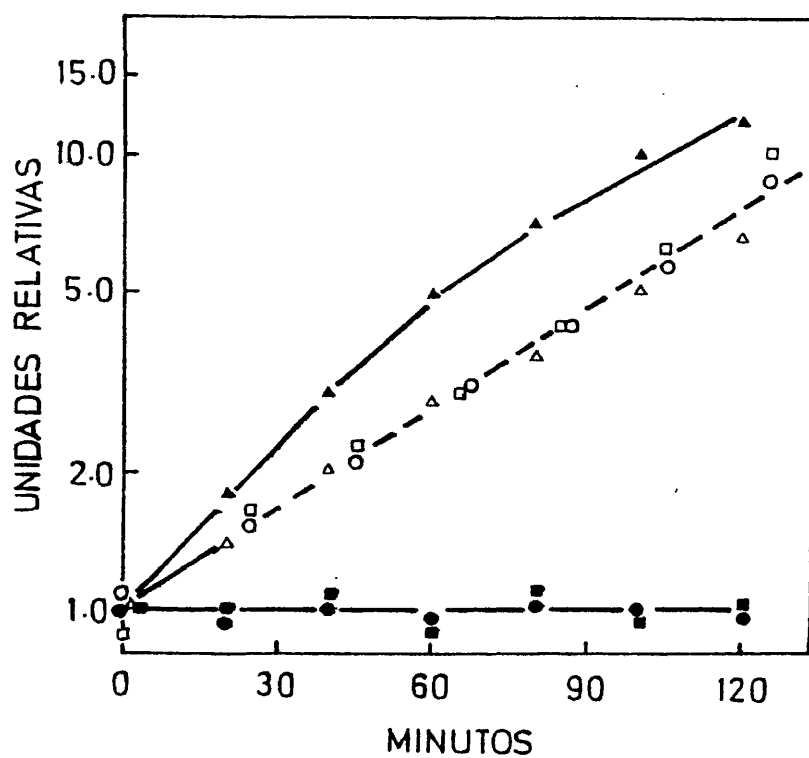
**Figura 3** CRECIMIENTO DE D-3 A 30°C Y 42°C

Un cultivo de D-3 en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C se subdividió en 2 alícuotas, transfiriéndose una de ellas a la temperatura restrictiva en el minuto 0. Símbolos blancos y línea punteada, 30°C; símbolos negros y línea continua, 42°C; ○, ● n° relativo de part.; △, ▲ valor relativo de la D.O.<sub>450</sub>; ▽, ▼ n° relativo de cpm; □, ■ n° relativo de viabiles. Los valores iniciales fueron de  $2.8 \times 10^7$  part/ml, 0.10 U.A.,  $6.0 \times 10^3$  cpm y  $2.0 \times 10^7$  viab/ml.



**Figura 4** MORFOLOGIA DE OV-2, D-2 Y D-3 A 30°C Y 42°C

Un cultivo de cada estirpe en fase de crecimiento exponencial en  $LBT_{20}$  a 30°C se transfirió a 42°C. En dicho momento (minuto 0), 80 minutos después y 160 minutos después se realizaron microfotografías de las células del cultivo. Aumento final, 984 x.



**Figura 5** CRECIMIENTO DE D-2 A 30°C Y 42°C

Una alícuota de D-2 en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C se transfirió a 42°C en el minuto 0. Símbolos blancos y línea discontinua 30°C; símbolos negros y línea continua, 42°C; ○, ● n° relativo de part/ml; (valor inicial,  $2.6 \times 10^7$  part/ml); □, ■ n° relativo de viab/ml (valor inicial  $1.5 \times 10^7$  viab/ml); △, ▲ valor relativo de D.O.<sub>450</sub> (valor inicial, 0.10 U.A.).

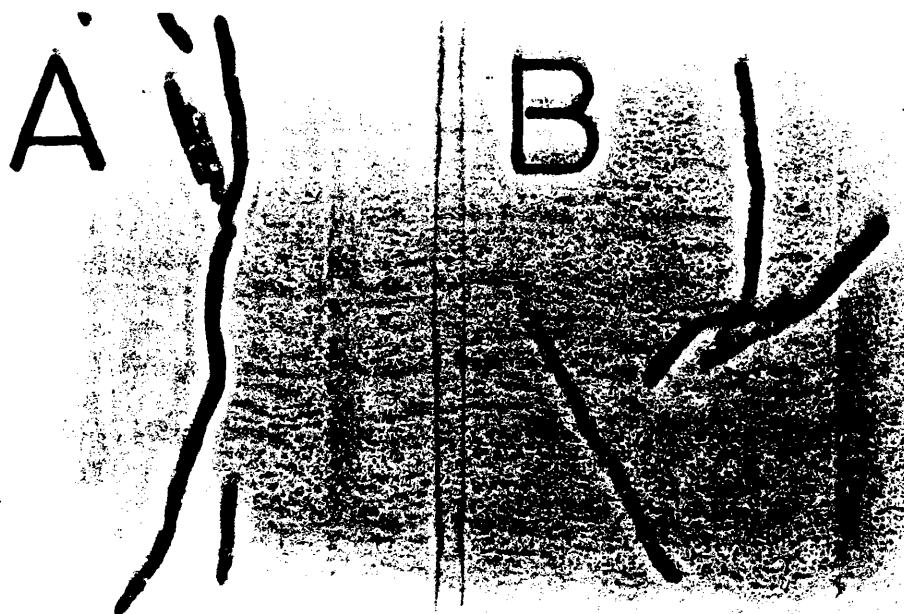


Figura 6 SEGREGACION DE NUCLEOIDES DE D-2 Y DE D-3 A 42°C

Un cultivo de cada estirpe en fase de crecimiento exponencial en NBT<sub>20</sub> a 30°C se transfirió a 42°C, incubándose a esta temperatura durante 60 minutos, al cabo de los cuales se tomó una muestra que fue tratada según el apartado 3.5.5 para la visualización de los nucleoides. A, D-2; B, D-3; aumento final, 3347 x.

#### 4.1.7 Medida de la duración del periodo de replicación en OV-2 a 30°C y 42°C

Dado el objetivo de nuestro trabajo, es decir, el estudio de las relaciones posibles entre el término del período de replicación del cromosoma bacteriano (período C) y la división celular, se procedió al estudio de la duración de éste en la cepa parental OV-2. El conocimiento de dicha duración es importante a la hora de la realización de una serie de tratamientos que se detallarán más adelante.

El sistema que se utilizó para la determinación de C fue el descrito por Pritchard & Zaritsky (143). Este método se basa en que la inhibición de la síntesis de proteínas de un cultivo exponencial impide la iniciación de nuevas rondas de replicación pero permite finalizar aquellas rondas que en el momento de la inhibición se encontraban en marcha.

El método utilizado consiste en medir el incremento en DNA ( $\Delta G$ ) en un cultivo en fase de crecimiento exponencial después de ser inhibida la síntesis de proteínas. Dicho incremento se midió por la incorporación de  $[6-^3H]$ -timina al DNA después de añadir cloramfenicol al medio en que crecía exponencialmente un cultivo que se había marcado uniformemente por incorporación de precursores radiactivos durante varias generaciones.

Este incremento está relacionado con el número de rondas de replicación en marcha que a su vez es función tanto de C como de  $\tau$ . La ecuación que relaciona estos parámetros es la siguiente:

$$\Delta G = \left( \frac{n 2^n \ln 2}{2^n - 1} - 1 \right) \times 100 \quad 9$$

siendo

$$n = \frac{C}{\tau}$$

Los incrementos obtenidos tras la realización del experimento (figura 7) fueron de un 74% a 30°C y de un 94% a 42°C. La duración del período C, calculada a partir de la fórmula anterior es:

$$C_{30^{\circ}} = 62 \text{ minutos}$$

$$C_{42^{\circ}} = 65 \text{ minutos}$$

#### 4.1.8 Medida de la duración del periodo D en las estirpes OV-2 y D-3 a 30°C

Imaginemos una población exponencial creciendo con un tiempo de generación  $\tau$  y con una distribución de edades celulares igual a la teórica de Powell (137), que rinde, tras un determinado tratamiento, unas divisiones residuales  $d$  (expresadas en tanto por uno). El tiempo antes de la división,  $t$ , al que se hace resistente a dicho tratamiento viene expresado por la siguiente ecuación:

$$t = \frac{\ln(1 + d)}{\ln 2} \tau \quad 10$$

El período D, definido como la etapa del ciclo celular en el que la división se hace resistente a la inhibición de síntesis de macromoléculas, puede ser fácilmente calculado a través de las divisiones residuales obtenidas al inhibir la síntesis de proteínas o de DNA en poblaciones con crecimiento exponencial, aplicando la ecuación 10 en donde consideramos que  $t$  sería equivalente a D en una primera aproximación, aunque rigurosamente la equivalencia no sea total.

La inhibición de la síntesis de DNA se realizó por adición de ácido nalidíxico al medio de cultivo. La inhibición de la síntesis de proteínas se realizó por ayuno total de aminoácidos o por adición de cloramfenicol. Los resultados de aplicar estos tratamientos a cultivos exponenciales de OV-2 y de D-3 se muestran en la figura 8. La medida de divisiones residuales obtenidas fué de un 28% para OV-2 y de un 22% para D-3. Aplicando la fórmula anterior se calculó el valor de D para ambas estirpes, resultando:

$D_{OV-2}$  a 30°C  $\approx$  16 minutos

$D_{D-3}$  a 30°C  $\approx$  13 minutos

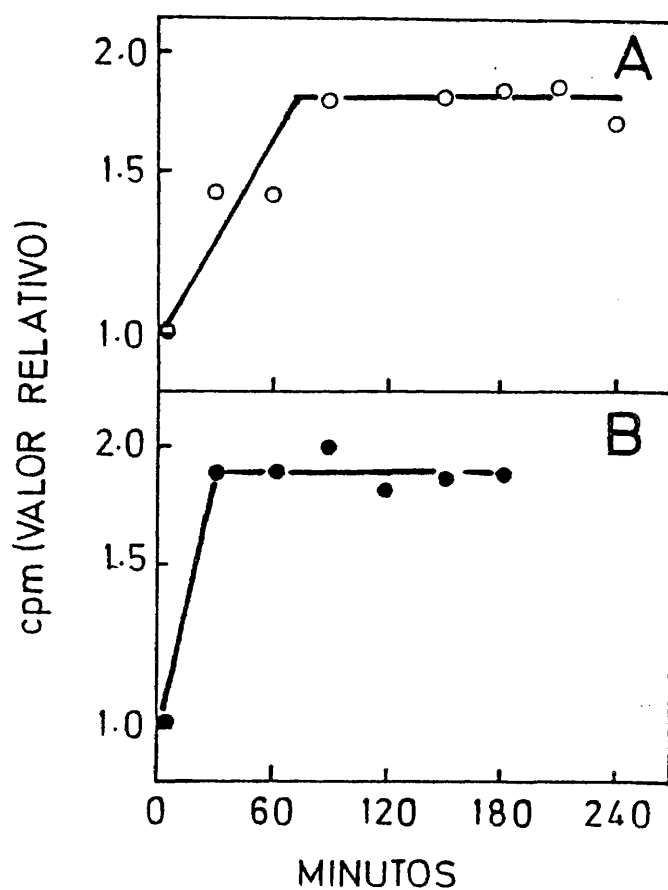
Los valores de D calculados de esta manera son un valor aproximado debido a la introducción en el método, teóricamente correcto, de varios parámetros que pueden inducir a error.

#### 4.1.9 Divisiones residuales en OV-2 y D-3 durante un ayuno de timina

El cálculo del periodo D se realizó por medida de las divisiones residuales tras inhibir la síntesis de proteínas por ayuno de aminoácidos o por adición de cloranfenicol y la síntesis de DNA por adición de ácido nalidíxico. Al ser OV-2 y D-3 auxótrofas para la timina, se podría inhibir la síntesis de DNA por ayuno de timina. Sin embargo, los resultados obtenidos tras un tratamiento de este tipo a cultivos en fase de crecimiento exponencial en medio M9R a 30°C de OV-2 o de D-3 son contradictorios con los observados tras tratamientos con ácido nalidíxico, cloranfenicol o ayuno de aminoácidos. Los resultados que se pueden observar en la figura 9 muestran que las divisiones residuales después de un ayuno de timina son de un 75% para OV-2 y de un 88% para D-3. Según la ecuación 10, la edad celular a la que se haría resistente la división celular a la inhibición de síntesis de DNA sería de 9 min para OV-2 y de 4 min para D-3, es decir, tendrían un periodo D igual a 36 minutos y 41 minutos respectivamente, en lugar de los 16 y 13 minutos calculados anteriormente.

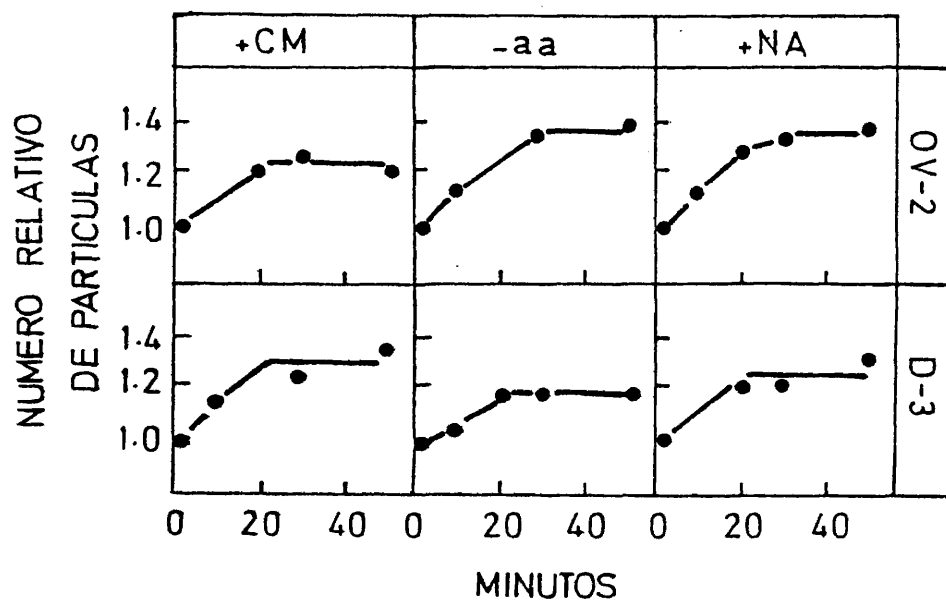
Este número, anormalmente elevado, de divisiones residuales obtenidas es probablemente reflejo de la existencia de un contenido interno de timina lo suficientemente elevado como para poder terminar rondas de replicación en marcha. Este hecho se verá confirmado, de una manera indirecta, por otros resultados que se comentarán mas adelante. Por tanto, si se desea inhibir totalmente en un momento dado la síntesis de DNA, habrá que recurrir al empleo de drogas tales como el ácido nalidíxico o la hidroxíurea.





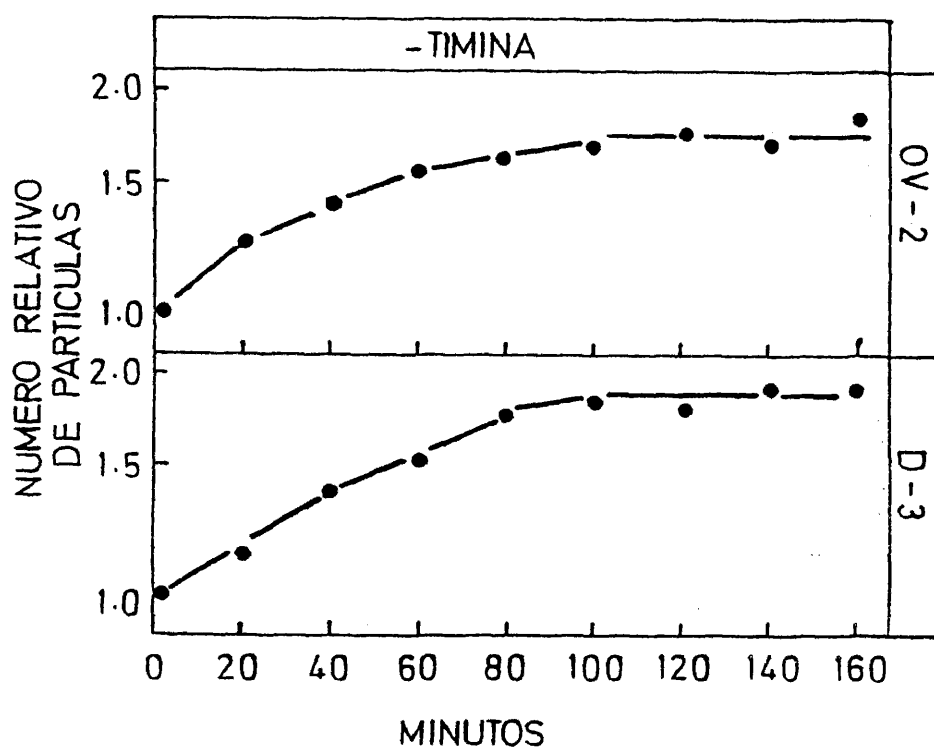
**Figura 7** INCREMENTO RESIDUAL DE DNA EN OV-2 A 30°C Y 42°C TRAS UNA INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS

A un cultivo de OV-2 en fase de crecimiento exponencial en LPT<sub>20</sub> a 30°C (Fig. 7-A) o 42°C (Fig. 7-B) con el DNA uniformemente marcado se le añadió CM (200 µg/ml) en el minuto 0. Se siguió la incorporación de <sup>3</sup>H-timina a partir de dicho momento. Valor inicial a 30°C, 2700 cpm; valor inicial a 42°C, 7500 cpm.



**Figura 8** DIVISIONES RESIDUALES DE OV-2 Y D-3 DESPUES DE UNA INHIBICION DE LA SINTESIS DE MACROMOLECULAS

A distintas alícuotas de cultivos de OV-2 y de D-3 en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C se les añadió en el minuto 0, CM (200 µg/ml) o NA (80 µg/ml) o bien se privó de aminoácidos al medio de cultivo. Valor inicial,  $1.0 \times 10^7$  part/ml (OV-2) y  $4.0 \times 10^7$  part/ml (D-3).



**Figura 9** DIVISIONES RESIDUALES DE OV-2 Y D-3 EN AUSENCIA DE TIMINA

A un cultivo en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C se le privó de timina en el minuto 0, siguiéndose la cinética de aumento en  $\lambda^0$  de part a partir de dicho momento. Valores iniciales,  $1.0 \times 10^7$  part/ml (OV-2) y  $4.0 \times 10^7$  part/ml (D-3).

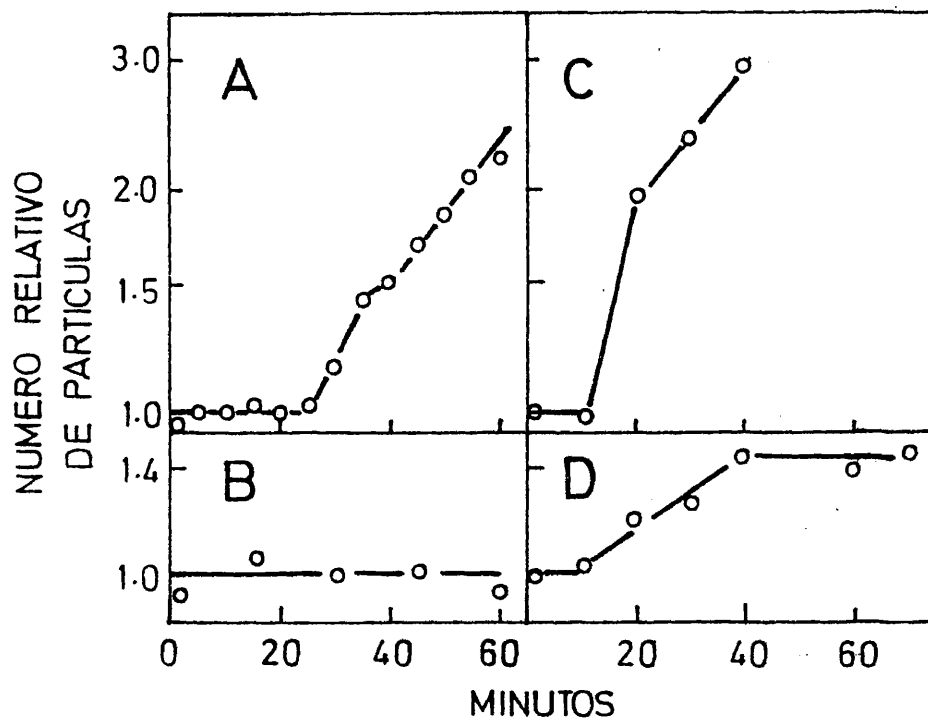
#### 4.1.10 Recuperación de la división a 30°C tras la inactivación térmica del producto del gen *ftsA*

Tal como se ha visto en apartados anteriores, en los mutantes D-2 y D-3 queda inhibida la división celular a 42°C pero no el resto de los procesos de su ciclo vital teniendo como resultado la filamentación de dichos mutantes. Al cabo de 30 minutos de incubación a la temperatura restrictiva se han duplicado todos los parámetros celulares medidos: masa (figuras 3 y 5), DNA (figura 3), volumen (datos no expuestos) y longitud (datos no expuestos). Por otra parte, la viabilidad, después de 30 minutos a 42°C, se mantiene, es decir, todos los filamentos de la población tras su retorno a 30°C son capaces de reanudar el proceso de división celular y por tanto de formar colonias.

El estudio de la recuperación de la división tras 30 minutos de incubación a 42°C puede aportar información valiosa acerca de las características del producto del gen *ftsA*.

En efecto, para que se recupere la división en estas condiciones solo será necesario, teóricamente al menos, la acción del producto del gen *ftsA*, ya que como hemos comentado todos los parámetros celulares se han duplicado durante los 30 minutos de incubación a 42°C. La acción de diversas drogas sobre la recuperación puede darnos datos acerca de la naturaleza del producto del gen *ftsA*. Al mismo tiempo, podremos conocer si dicho producto, inactivado a 42°C, vuelve a ser activo tras su retorno a 30°C o, si por el contrario, debe ser sintetizado de nuevo.

Los resultados de un experimento de este tipo se muestran en la figura 10. Podemos observar que la división se reanuda tras 25 minutos después del retorno a la temperatura permisiva en el caso de D-3 o tras 10 minutos en el caso de D-2. Asimismo, podemos observar que para que dicha reanudación ocurra en D-3 hace falta síntesis de proteínas ya que su inhibición, efectuada por adición de cloramfenicol al medio de cultivo, impide la recupera-



**Figura 10** RECUPERACION DE LA DIVISION EN POBLACIONES DE FILAMENTOS DE D-2 Y D-3

Un cultivo en fase de crecimiento exponencial a 30°C en LBT<sub>20</sub> a 30°C fue incubado a 42°C durante 30 minutos al cabo de los cuales se subdividió en dos alícuotas que se retornaron a 30°C (tiempo 0) añadiendosele a una de ellas CM (200 µg/ml). A, D-3, 30°C; B, D-3, 30°C + CM; C, D-2, 30°C; D, D-2, 30°C + CM. N° inicial de part./ml,  $2.3 \times 10^7$  (D-2) y  $3.0 \times 10^7$  (D-3).

ción de la división. Este resultado indica que el producto del gen ftsA es una proteína. Sin embargo, la recuperación de la división en el mutante D-2 se hace independiente de síntesis de proteínas, ya que en condiciones que inhiben la traducción se produce hasta un 50% de divisiones celulares. Estos resultados parecen indicar que la proteína producto del gen ftsA-3 es irreversible tras su inactivación, mientras que la del gen ftsA-2 vuelve a recobrar su actividad tras el retorno a la temperatura permisiva.

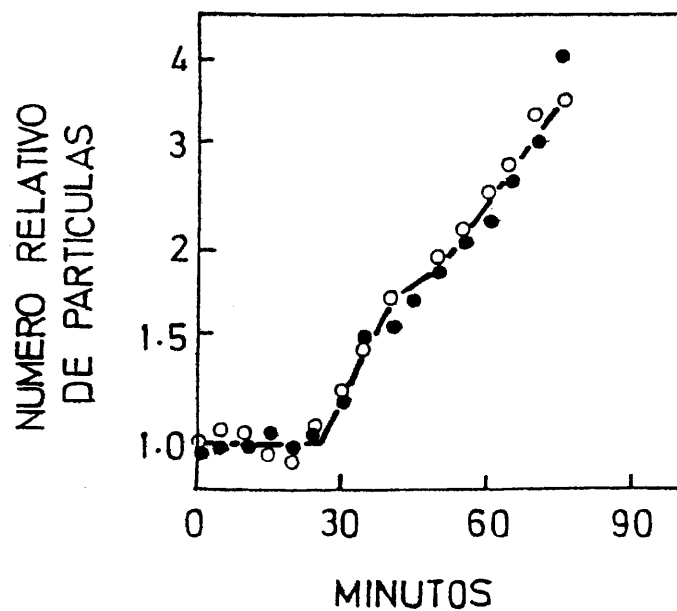
La proteína producto del gen ftsA se denominará en adelante proteína FtsA : FtsA-3 a la forma alélica presente en D-3 y FtsA-2 a la forma presente en D-2.

El hecho de que el tiempo de recuperación en D-3 sea mayor que en D-2 puede explicarse si la proteína FtsA-3 debe ser sintetizada de nuevo mientras que la proteína FtsA-2, al ser reversible, no.

Además, el hecho de que la división no se reanude enseguida parece querer indicar que las células no quedan simplemente detenidas, "congeladas", en su ciclo de división celular, sino que retornan a una fase anterior. Esto parece quedar apoyado por la cinética de recuperación observada. La primera división presenta una cierta sincronía como si a todas las células de la población les faltase el mismo tiempo hasta su división.

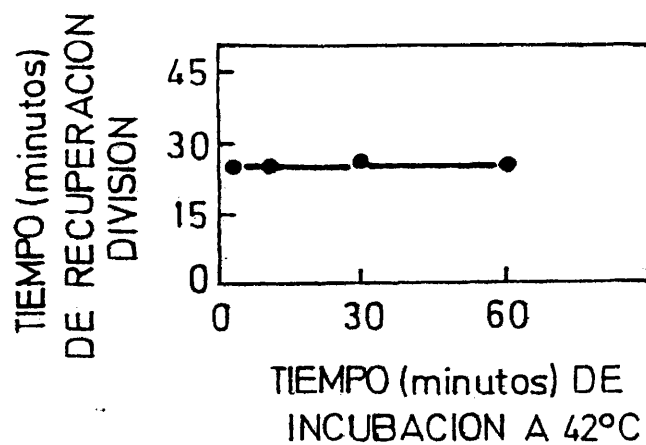
#### 4.1.11 Efecto del tiempo de incubación a la temperatura restrictiva sobre el tiempo de recuperación de la división tras el retorno a la temperatura permisiva en D-3

Para observar las posibles relaciones existentes entre tiempo de incubación a 42°C y tiempo de recuperación a 30°C, se sometieron diversas alícuotas de una población de D-3 a incubación a la temperatura restrictiva durante períodos comprendidos entre cinco y 60 minutos. Una vez realizada la incubación se transfirieron los cultivos a condiciones permisivas, los resultados se muestran en las figuras 11 y 12 e indican que el tiempo de recu-



**Figura 11** RECUPERACION DE LA DIVISION DE FILAMENTOS DE D-3 A 30°C

Un cultivo de D-3 en fase de crecimiento exponencial en  $LBT_{20}^a$  a 30°C se incubó a 42°C durante 10 (●) ó 30 (○) minutos al cabo de los cuales se retornó a 30°C (tiempo 0). N° inicial,  $2.5 \times 10^7$  part/ml.



**Figura 12** TIEMPO DE RECUPERACION DE LA DIVISION A 30°C EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION A 42°C

Un cultivo de D-3 en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C se subdividió en varias alícuotas que se incubaron a 42°C durante distintos tiempos, al cabo de los cuales se retornaron a 30°C analizandose en cada alícuota el tiempo en que tardaba en recuperarse la división.



peración es independiente del tiempo de incubación e igual a 25 minutos.

Estos resultados son compatibles con que la proteína FtsA-3 comenzara a sintetizarse 25 minutos antes de la división y terminase 15 minutos antes de esta. La acción de la proteína FtsA-3 terminaría en el mismo momento de la división. Es decir, la síntesis de PA ocurriría al término del período de replicación y su acción transcurriría durante el periodo D.

#### 4.1.12 Estudio de la septación, bajo condiciones permisivas, de los filamentos de D-3 y de D-2

Se estudió la septación en cultivos que habían sido preincubados durante 60 minutos a 42°C. Se siguió el proceso de septación, en condiciones permisivas, por medio de microfotografías seriadas. Se realizó este estudio en filamentos de D-3 a la temperatura ambiente y de filamentos de D-2 a la misma temperatura con presencia o no de cloramfenicol. Las secuencias microfotográficas se muestran en las figuras 13, 14 y 15. Estos resultados, junto con otros no expuestos, muestran que la septación ocurre bien a partir de los extremos, bien de la zona central o bien a partir de una zona media.

#### 4.1.13 Efecto del tiempo de generación de D-3 sobre el tiempo de recuperación de la división a temperatura permisiva tras un pulso a 42°C

A continuación se analizó la influencia del tiempo de generación sobre la recuperación a 30°C tras 10 minutos de incubación a la temperatura restrictiva. Si efectivamente la proteína FtsA-3 se sintetiza al término del período de replicación y ejerce su acción durante el período D el tiempo de recuperación debería ser independiente del tiempo de generación, ya que la duración del período de replicación y de D lo son (12,23,110). Los medios de cultivo utilizados, así como el tiempo de generación que presen-

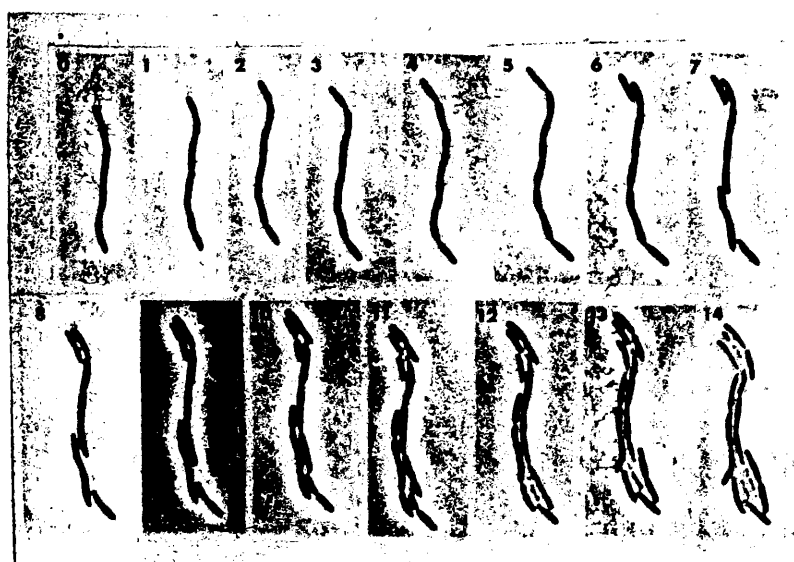
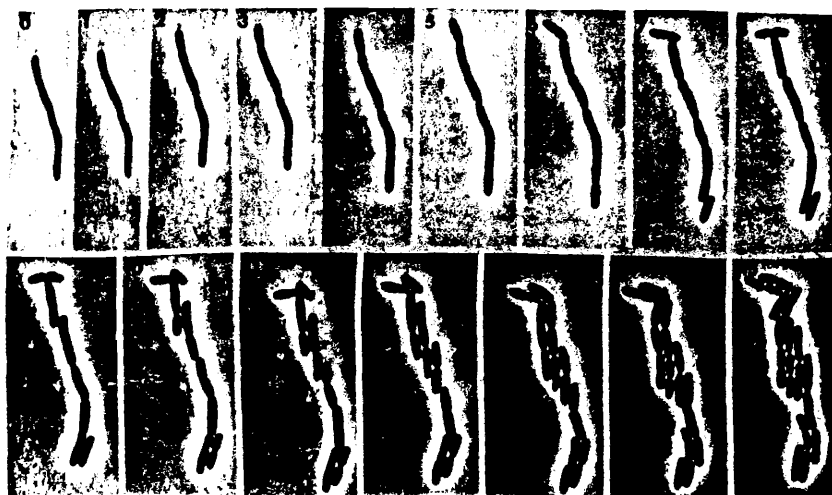


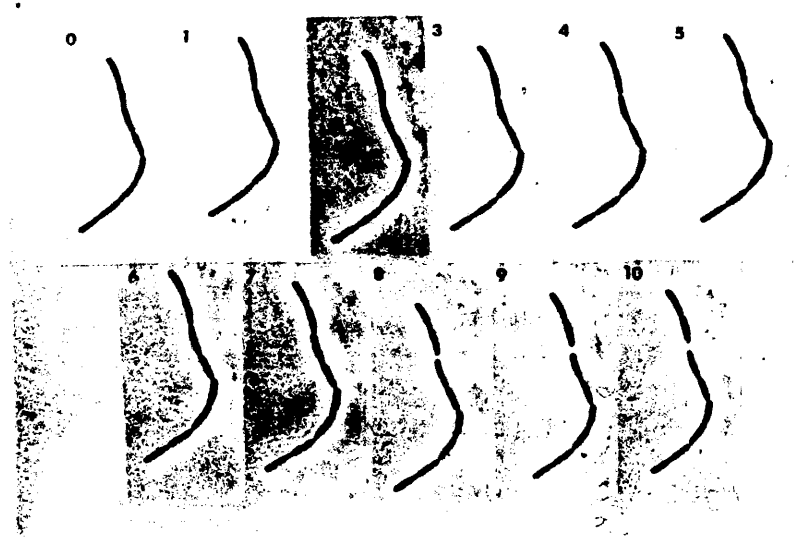
Figura 13 RECUPERACION DE LA DIVISION DE UN FILAMENTO DE D-3

Un cultivo de D-3 en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C se incubó a 42°C durante 60 minutos, al cabo de los cuales se tomó una muestra que se depositó en un portaobjetos con agar nutritivo a la temperatura ambiente (minuto 0). A partir de este momento se tomaron microfotografías seriadas cada 10 minutos. Aumento final, 1469 x



**Figura 14** RECUPERACION DE LA DIVISION DE UN FILAMENTO DE D-2

Un cultivo de D-2 en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C se incubó a 42°C durante 60 minutos, al cabo de los cuales se tomó una muestra que se depositó en un portaobjetos con agar nutritivo a la temperatura ambiente (minuto 0). A partir de este momento se tomaron microfotografías seriadas cada 10 minutos. Aumento final, 1469 x



**Figura 15** RECUPERACION, EN AUSENCIA DE SINTESIS DE PROTEINAS, DE LA DIVISION DE UN FILAMENTO DE D-2

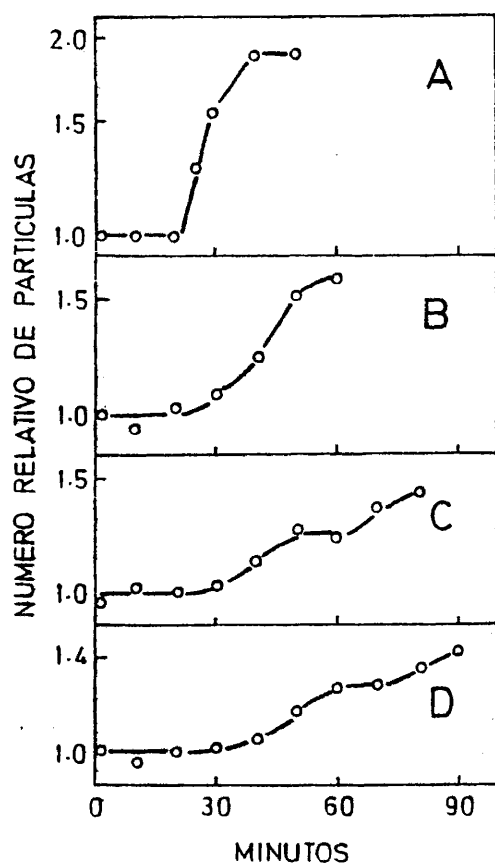
Un cultivo de D-2 en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C se incubó a 42°C durante 60 minutos, al cabo de los cuales se tomó una muestra que se depositó en un portaobjetos con agar nutritivo más CM (200 µg/ml) a la temperatura ambiente (minuto 0). A partir de este momento se tomaron microfotografías seriadas cada 10 minutos. Aumento final, 1469 x

taba la estirpe D-3 en ellos a la temperatura permisiva, se resumen en la tabla VII.

Tabla VII Medios de cultivo y tiempos de generación (en minutos) para D-3 a 30°C

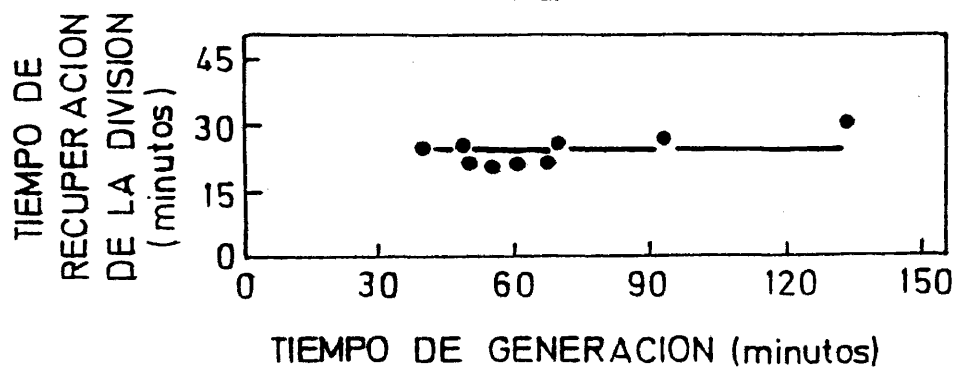
Medio de cultivo	$\tau$
LBT <sub>20</sub>	45
M9R	48
M9R - bases púricas y pirimidínicas	50
Medio mineral M9 + glicerol (8 mg/ml) + requerimientos (20 µg/ml) + bases <u>nitro</u> genadas (60 µg/ml) + casaaminoácidos (1 mg/ml)	58
M9 + casaaminoácidos (1 mg/ml)	60
M9 + casaaminoácidos (100 µg/ml)	67
M9 + leucina (20 µg/ml) + casaaminoácidos (50 µg/ml)	69
M9 + leucina (20 µg/ml)	93
M9	134

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 16 y 17. Como se puede observar el período de síntesis y acción de la proteína FtsA-3 es independiente del tiempo de generación e igual a 25 minutos. También podemos observar que si bien la recuperación ocurre a los 25 minutos el porcentaje de la población que se divide sincronicamente depende del tiempo de generación.



**Figura 16** CINÉTICAS DE DIVISION DE D-3 A 30°C DESPUES DE 10 MINUTOS A 42°C CRECIENDO A DISTINTOS TIEMPOS DE GENERACION

Se transfirieron a 42°C cultivos de D-3 en fase de crecimiento exponencial y se incubaron a esta temperatura durante 10 minutos al cabo de los cuales (tiempo 0) fueron retornados a 30°C siguiendose el aumento en n° de partículas. A, LBT<sub>20</sub>,  $\Upsilon = 41'$ , valor inicial de  $5 \times 10^7$  part/ml; B, M9 + leucina (20  $\mu\text{g/ml}$ ) + casaaminoácidos (50  $\mu\text{g/ml}$ ),  $\Upsilon = 69'$ , valor inicial de  $2.2 \times 10^7$  part/ml; C, M9 + leucina (20  $\mu\text{g/ml}$ ),  $\Upsilon = 93'$ , valor inicial de  $3.4 \times 10^7$  part/ml; D, M9,  $\Upsilon = 138'$ , valor inicial de  $4.8 \times 10^7$  part/ml.



**Figura 17** RELACION ENTRE TIEMPO DE RECUPERACION DE LA DIVISION Y TIEMPO DE GENERACION TRAS LA INACTIVACION TERMICA DE LA PROTEINA FTSA-3

Cultivos de D-3 a 30°C en fase de crecimiento exponencial en diversos medios de cultivo y con distintos tiempos de generación (tabla VII) fueron incubados durante 10 minutos a 42°C antes de retornarlos a 30°C, analizándose el tiempo que tardaban en recomenzar la división.

Así a tiempos de generación largos dicho porcentaje es mas bajo que a tiempos de generación cortos. Estos resultados nos permiten calcular de una manera diferente el período de síntesis y acción de la proteína FtsA-3. En efecto al ser dicho período constante e independiente del tiempo de generación, la proporción de la población celular afectada por los 10 minutos del período de incubación a 42°C será mayor cuanto menor sea el tiempo de generación. La ecuación 10 nos relaciona el tanto por uno de divisiones sincrónicas (d), el tiempo de generación ( $\tau$ ) y la duración del periodo de síntesis y acción de la proteína FtsA-3 (t) más el tiempo de incubación a 42°C (10 minutos)

$$t + 10 = \frac{\ln (1 + d)}{\ln 2} \tau \quad 10$$

Aplicando esta ecuación para los distintos tiempos de generación se obtiene un valor medio del período de síntesis y acción de la proteína FtsA-3 de 28 minutos.

#### 4.1.14 Localización temporal de la acción de la proteína FtsA

Los resultados expuestos hasta ahora parecen sugerir que la proteína FtsA se sintetiza y actúa durante los 25 minutos finales del ciclo de división celular. Si esto fuese así, una célula no sufriría retraso en su división si se incubase a la temperatura restrictiva desde el momento de su nacimiento hasta 25 minutos antes de su división. Por el contrario si el período de incubación a 42°C solapase con los 25 minutos anteriormente dichos la división ocurriría, al menos, 25 minutos después del retorno a 30°C.

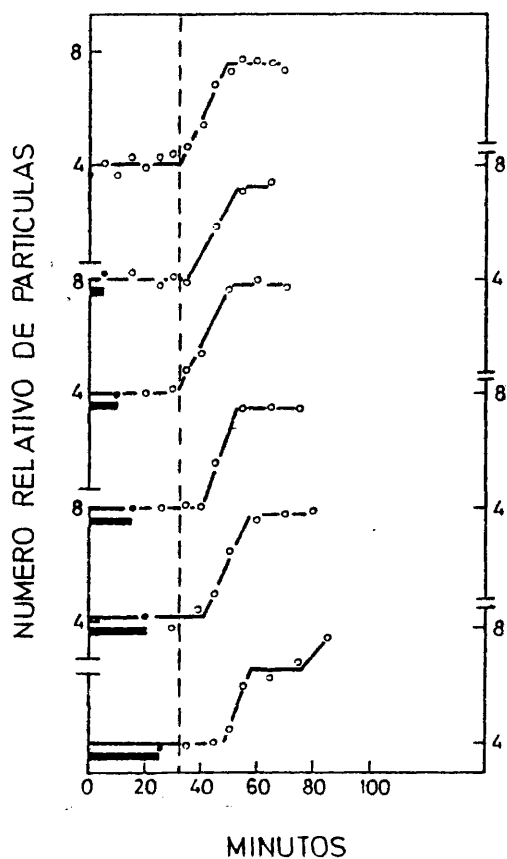
Para determinar si nuestra suposición era correcta se estudió el efecto de choques de duración creciente a 42°C sobre la división de cultivos sincronizados. El método de sincronización fue el de selección de tamaño en gradiente de sacarosa (122). Las células así seleccionadas se subdividieron en diversas alícuotas que se incubaron a 42°C durante tiempos crecientes antes



de retornarlas a la temperatura permisiva. La división, en la población celular control, es decir a la que no se le dió un tratamiento a 42°C comenzó a los 32 minutos de su selección, dividiéndose un 80% aproximadamente de las células. Los resultados se pueden observar en la figura 18 e indican que la acción de la temperatura restrictiva no retarda la división celular si la incubación a dicha temperatura finaliza 22 minutos antes del comienzo de la división en la población control. Por el contrario si el período de incubación a dicha temperatura se prolonga mas allá de los mencionados 22 minutos la división comienza a retrasarse en comparación con la población control y ocurriendo dicha división a los 25 minutos aproximadamente del retorno a la temperatura permisiva.

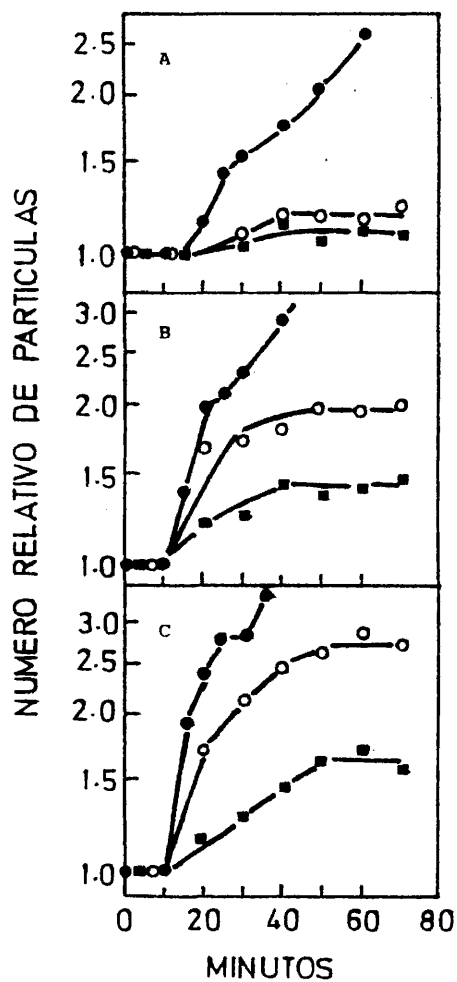
#### 4.1.15 Efecto del tiempo de incubación a la temperatura restrictiva sobre el tiempo de recuperación de la división en D-2

De resultados anteriores sabemos que el tiempo de recuperación de la división de D-3 tras un choque térmico que inactive la proteína FtsA es independiente del tiempo que se ha mantenido el cultivo a la temperatura restrictiva para D-3. Los resultados obtenidos con D-2 en experimentos en los que se analizó la cinética de recuperación de cultivos exponenciales de dicho mutante incubados a 42°C durante tiempos crecientes corroboraron los resultados obtenidos en D-3 (figura 19). Así, el tiempo que tardó la división en recuperarse osciló entre los 10 y los 15 minutos independientemente de la duración de la incubación (tiempos comprendidos entre 5 y 60 minutos). La cinética, sin embargo, era distinta a la obtenida para D-3 en cuanto que la pendiente de la curva de recuperación era tanto mayor cuanto mayor era el tiempo de incubación. Asimismo, las divisiones residuales obtenidas en condiciones inhibitorias de la síntesis de proteínas o de DNA eran también tanto mayores cuanto mayor era el tiempo de incubación del cultivo a la temperatura restrictiva. Esto es lógico ya que la proteína FtsA-2 sintetizada a 42°C pasa a ser activa tras el retorno del cultivo a 30°C. Todas aquellas células que hayan sin-



**Figura 18** RETRASO EN LA DIVISION POR CHOQUES DE TEMPERATURA A DISTINTAS EDADES CELULARES

Se seleccionó una población sincrónica de células pequeñas de D-3 por medio de centrifugación en gradiente de sacarosa. En el momento de la selección (minuto 0) se subdividió el cultivo en alícuotas, permaneciendo una de ellas a 30°C y dando choques a 42°C de duración creciente a partir del minuto 0 al resto de ellas. Las barras negras indican la duración del período a 42°C. El valor inicial fue de  $4.0 \times 10^6$  part./ml. La línea quebrada indica el momento en que comenzó la división en el cultivo control.



**Figura 19** RECUPERACION DE LA DIVISION A 30°C EN FILAMENTOS DE D-2

Un cultivo de D-2 en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C se incubó a 42°C durante 5 (A), 30 (B) ó 60 (C) minutos, al cabo de los cuales se subdividió en 3 alícuotas al tiempo que se retornaban a 30°C (minuto 0), añadiéndose en dicho momento NA a 80 µg/ml (○), CM a 200 µg/ml (■) o nada (●). Valor inicial,  $2.5 \times 10^7$  part/ml.

tetizado dicha proteína durante el período a 42°C podrá dividirse, por tanto, en ausencia de síntesis de DNA y proteínas siempre que, como es obvio, las células presenten todos los requerimientos para su división cumplidos.

4.1.16 Efecto de la inhibición de la síntesis de DNA, de RNA, de proteínas y de la acción de la proteína FtsA sobre la recuperación de la división de filamentos de D-3

De experimentos anteriores sabemos que la proteína FtsA en el mutante D-3 debe ser sintetizada de nuevo tras su desnaturalización a 42°C. También sabemos que su período de síntesis y acción es de 25 minutos. Con los experimentos siguientes se intenta determinar el tiempo máximo de síntesis y el tiempo mínimo de acción. También se intenta determinar la necesidad de transcripción así como la posible necesidad de síntesis de DNA para la síntesis o actuación de la proteína FtsA.

Los tratamientos para inhibir estos procesos se realizaron según se describen a continuación:

- 1.- Inhibición de la síntesis de proteínas: por adición de CM al medio de cultivo.
- 2.- Inhibición de la síntesis de RNA: por adición de rifampicina al medio de cultivo.
- 3.- Inhibición de la síntesis de DNA: por adición de NA al medio de cultivo (no se utilizó el ayuno de timina ya que las células presentan un contenido interno de timina relativamente alto, como se ve en el apartado 4.1.9).
- 4.- Inhibición de la acción de FtsA por transferencia a la temperatura restrictiva.

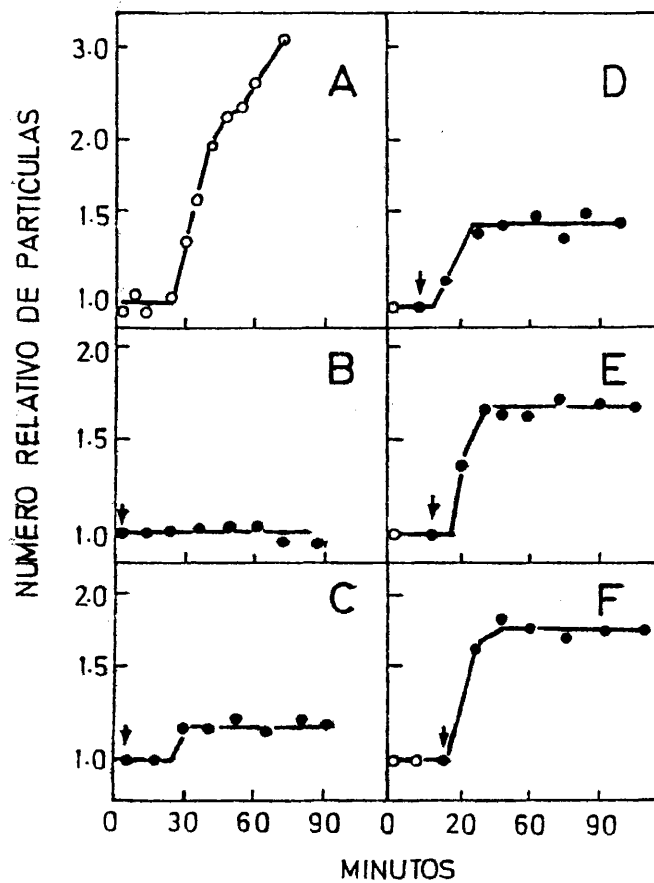
Un cultivo en fase de crecimiento exponencial de D-3 en LBT<sub>20</sub> a 30°C se transfirió a 42°C incubándose a esta temperatura durante 30 minutos. Tal como se ha dicho anteriormente, en D-3, tras 30 minutos a 42°C, todos los parámetros medidos cuya duplicación es

necesaria para la división, ya se han duplicado. Por tanto, tras 30 minutos a la temperatura restrictiva, solo la síntesis y acción de la proteína FtsA es necesaria para la división. Al cabo de los 30 minutos se subdividió el cultivo en varias alícuotas que se transfirieron a 30°C (tiempo 0). A partir de este momento se siguió la cinética de división de una de las alícuotas (figura 20-A) pudiéndose observar que tarda 25 minutos en comenzar la división. A las otras alícuotas se les añadió rifampicina en el mismo momento de su retorno a 30°C (figura 20-B), 6 minutos después (fig. 20-C), 12 (fig. 20-D), 18 (figura 20-E) y 24 (figura 20-F). A todas estas alícuotas se les siguió la cinética de división. Como se puede observar si el inhibidor se añadía en el mismo momento del retorno a 30°C no se obtenían divisiones, si se añadían 6 minutos después se obtenían un 16%, si 12 minutos después un 44%, si 18 minutos después un 69% y si 24 minutos después un 75% de divisiones. Este mismo experimento se realizó sustituyendo la rifampicina por cloramfenicol, ácido nalidixico, hidroxihurea o 42°C. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 23 en la que se representa el número relativo de células tras 70 minutos a partir de la inhibición frente al tiempo en que se realizó la inhibición después del retorno a 30°C.

Para calcular el número relativo se consideró igual al número final de células dividido por el número inicial, o lo que es igual, al tanto por uno de divisiones mas uno.

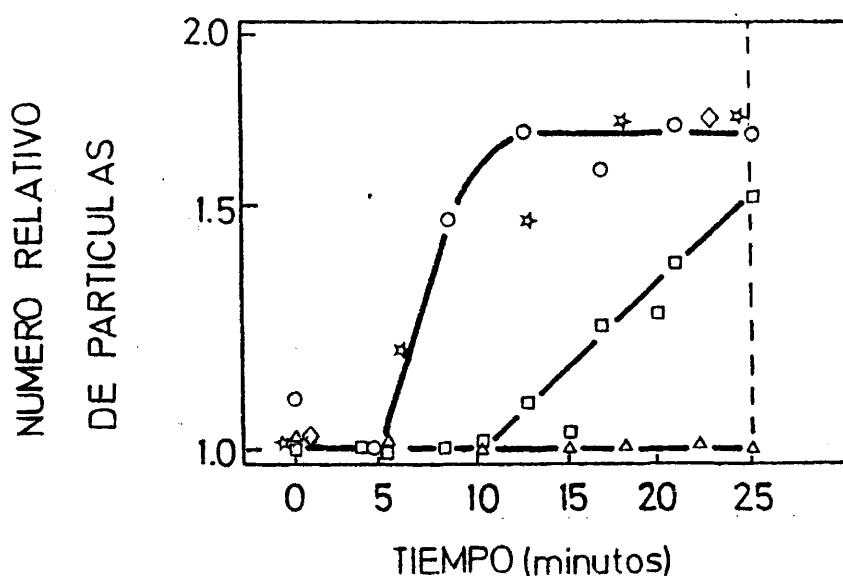
$$N.R. = \frac{N_f^{\circ} \text{ células}}{N_i^{\circ} \text{ células}} = 1 + \frac{\% \text{ divisiones}}{100}$$

En la figura 21 podemos observar que si se inhibe la síntesis de DNA, de RNA o de proteínas en el momento del retorno a 30°C la división queda inhibida. La resistencia de la división a inhibición de RNA o de DNA comienza 5 minutos después del retorno a 30°C mientras que la resistencia a inhibición de síntesis de proteínas ocurre 10 minutos a partir del retorno a la temperatura permisiva.



**Figura 20** EFECTO DE LA INHIBICION DE LA TRANSCRIPCION SOBRE LA RECUPERACION DE LA DIVISION, DESPUES DE UNA INCUBACION DE 30 MINUTOS A 42°C, DE D-3 A 30°C

Un cultivo de D-3 en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C se incubó durante 30 minutos a 42°C. Al cabo de este período (minuto 0) se subdividió el cultivo en alícuotas que se retornaron a 30°C añadiéndoles RF (500 µg/ml) en el minuto 0 (B), 6 (C), 12 (D), 18 (E) ó 24 (F); el momento de la adición se indica por una flecha. Al cultivo control (A) no se le añadió nada. El n° inicial fue de  $4 \times 10^7$  part./ml.



**Figura 21** EFECTO DE LA INHIBICION DE SINTESIS DE PROTEINAS, REPLICACION Y TRANSCRIPCION DEL DNA Y DE LA TEMPERATURA SOBRE LA RECUPERACION DE LA DIVISION DESPUES DE UNA INCUBACION DE 30 MINUTOS A 42°C EN D-3

Un cultivo de D-3 en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C se incubó a 42°C durante 30 minutos, siendo transferido posteriormente a 30°C. En dicho momento, el cultivo se subdividió en varias porciones. Una alícuota, incubada a 30°C se dividió a los 25 minutos después del retorno a 30°C (este momento se indica por medio de una raya quebrada vertical). Un grupo de alícuotas fueron transferidas a 42°C (△) a los tiempos indicados. A otras alícuotas se les añadió, a diversos tiempos, NA a 80 µg/ml (○), HU a 15 mg/ml (◇), RF a 500 µg/ml (☆) y CM a 200 µg/ml (□). En todos los casos se siguieron las cinéticas de aumento en partículas desde el comienzo del tratamiento, midiéndose el número relativo de partículas al cabo de 70 minutos del inicio del tratamiento. En la gráfica se representa en ordenadas el número relativo de partículas después de 70 minutos del comienzo del tratamiento y en abscisas el momento a partir del retorno a 30°C en que dió comienzo el tratamiento inhibitorio. El número inicial fue de  $3.0 \times 10^7$  part/ml en todos los casos.

Los resultados obtenidos indican que para que la división celular se recupere tras 30 minutos de incubación a 42°C hace falta:

- 1.- Síntesis de DNA
- 2.- Síntesis de RNA
- 3.- Síntesis de proteínas
- 4.- Temperatura de 30°C (es decir actividad de la proteína FtsA).

Los puntos 3 y 4 eran lógicos de esperar y concuerdan con experimentos anteriores. La necesidad de transcripción es asimismo lógica. La necesidad de síntesis de DNA fue algo no esperado. El hecho de que los datos sean iguales empleando ácido nalidíxico o hidroxilurea descarta en gran parte que este resultado sea un artefacto, como podría ocurrir si dichos inhibidores además de inhibir la síntesis de DNA inhibieran la división. Esto último no parece muy lógico ya que se produce división en presencia del inhibidor cuando este es añadido 10 minutos o más tiempo después del retorno a 30°C. No parece, por tanto, que los inhibidores de síntesis de DNA utilizados tengan un efecto notable sobre la inhibición de la división celular. La única explicación plausible sería que, bajo las condiciones descritas, la recuperación de la división necesita de síntesis de DNA. La razón de ser de esta síntesis puede tener una doble explicación: o bien ser necesaria para la síntesis de la proteína FtsA-3 o bien serlo para la acción de dicha proteína.

#### 4.1.17 Efecto de la inhibición de la síntesis de DNA, de RNA, de proteínas y de la acción de la proteína FtsA sobre la recuperación de la división de filamentos de D-2

En apartados anteriores se ha podido deducir que la proteína FtsA-2 vuelve a ser activa si tras su inactivación a 42°C es transferida a 30°C.

Por tanto, después de 30 minutos de incubación a la temperatura restrictiva, las células de D-2 serán capaces de dividirse



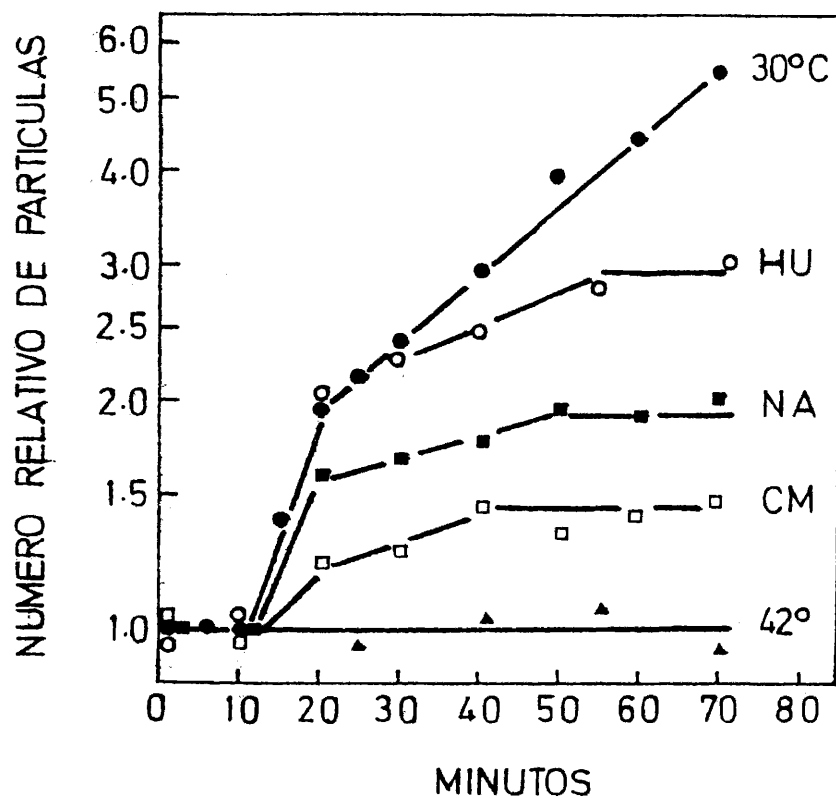
en ausencia de síntesis de proteínas y de transcripción. Si dicha división puede realizarse en ausencia de síntesis de DNA nos indicará que la replicación es necesaria para la inducción de la síntesis de la proteína FtsA. En cambio, si D-2, en estas condiciones es incapaz de dividirse en ausencia de replicación, nos indicará que la síntesis de DNA es necesaria para la acción (y quizás síntesis) de la proteína FtsA.

Se realizó un experimento con una población de D-2 en fase de crecimiento exponencial. Se incubó dicha población a 42°C durante 30 minutos al cabo de los cuales se subdividió en varias alícuotas que se retornaron a 30°C, añadiéndoseles, en dicho momento, diversos inhibidores de la síntesis de DNA, de proteínas o de la acción de la proteína FtsA.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22 e indican que en estas condiciones la recuperación de la división es independiente de síntesis de proteínas, de RNA y de DNA. En estas condiciones, la única diferencia entre las proteínas FtsA-2 y FtsA-3 es que FtsA-3 debe ser sintetizada mientras que FtsA-2 no. Ambas proteínas deben actuar para que la división se recupere. La síntesis de DNA no es pues necesaria para la actuación de la proteína FtsA, ya que la división en D-2 se recupera en condiciones inhibitorias de síntesis de DNA. Por tanto, la síntesis de DNA es necesaria específicamente para la síntesis de la proteína FtsA.

#### 4.1.18 Resistencia a antibioticos $\beta$ -lactamicos de los mutantes *ftsA*

Ricard e Hirota (144) habían descrito en varios mutantes *fts* una mayor resistencia a la lisis inducida por penicilina. Donachie (158) sugiere una relación fuerte entre la acción de la proteína de terminación y la actuación de la penicilina. Estos hechos nos llevaron a analizar la resistencia de OV-2 y los mutantes D-2 y D-3, a distintos antibioticos de la familia de los  $\beta$ -lactamicos. El análisis se realizó tanto a 30°C como a 42°C.



**Figura 22** CINETICA DE RECUPERACION DE LA DIVISION A 30°C, BAJO DIVERSAS CONDICIONES, DE FILAMENTOS DE D-2

Un cultivo de D-2 en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C se incubó a 42°C durante 30 minutos. Al cabo de este período se subdividió el cultivo en varias alícuotas que se transfirieron a 30°C (minuto 0) añadiéndoseles en dicho momento NA a 80 µg/ml (■), HU a 15 mg/ml (○), CM a 200 µg/ml (□) o nada (●). A una de las alícuotas se la volvió a transferir inmediatamente a 42°C (▲). El valor inicial fue de  $2.3 \times 10^7$  part/ml.

El proceso fue el siguiente: Un cultivo en fase exponencial se subdividió en 12 alícuotas a las que se añadieron distintas concentraciones de antibiótico en el tiempo 0, continuándose la incubación a 30°C o bien a 42°C (en este último caso la transferencia a la temperatura restrictiva se realizó al tiempo 0). La D.O. se midió en el mismo momento de la adición del antibiótico y 90 minutos después (en el caso de los cultivos incubados a 30°C) o 50 minutos después (en el caso de los cultivos incubados a 42°C). El tiempo fué elegido de manera que el total correspondiese con 2 tiempos de generación a cada temperatura. Los resultados para OV-2, D-2 y D-3, para 30°C y 42°C y para la bencil-penicilina, ampicilina, cefaloridina, cefalexina, mecillinam y ácido 6-amino-penicilánico se muestra en las figuras 23, 24 y 25.

Como podemos ver, la resistencia a la lisis inducida por  $\beta$ -lactámicos es idéntica para las tres estirpes y para todos los antibióticos a 30°C. Sin embargo, a 42°C, los mutantes D-2 y D-3 presentan una resistencia notablemente mayor a la bencil-penicilina y a la ampicilina y una resistencia ligeramente superior a la cefalexina, es decir, a aquellos antibióticos  $\beta$ -lactámicos que, a baja concentración, producen una inhibición de la división celular. La sensibilidad a aquellos antibióticos que afectan a la elongación celular (cefaloridina) o a la forma (mecillinam o ácido 6-amino-penicilánico) es idéntica tanto a 30°C como a 42°C en las estirpes mutantes y salvaje.

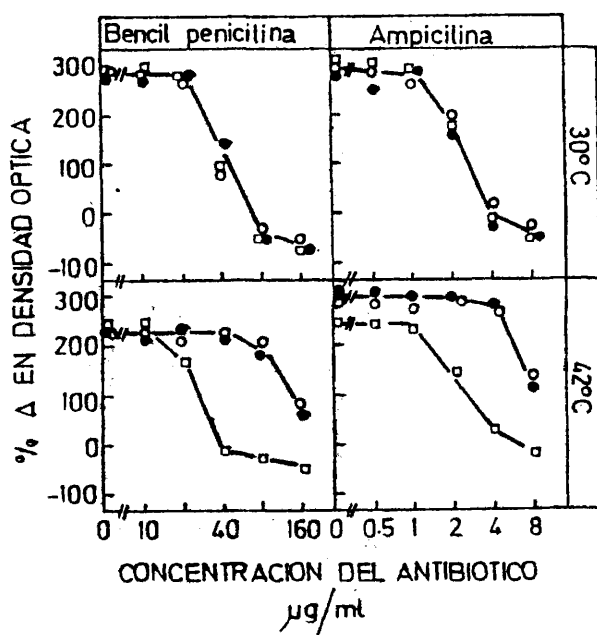
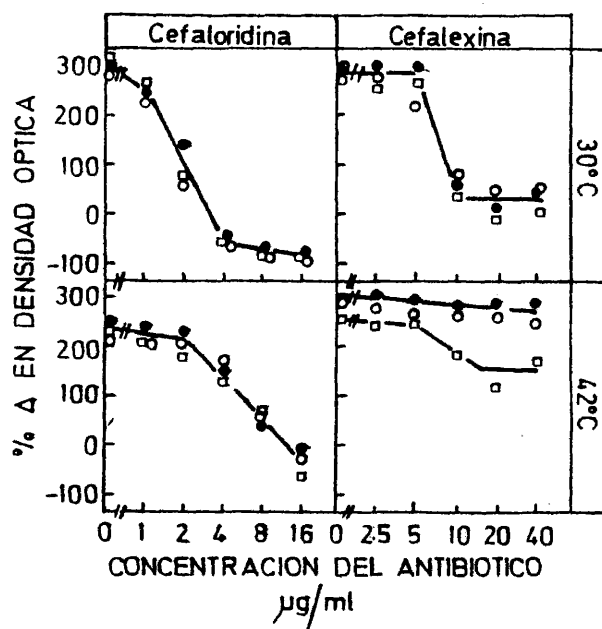


Figura 23 ACCION DE LA BENCIL-PENICILINA Y DE LA AMPICILINA SOBRE LAS ESTIRPES OV-2, D-2 Y D-3

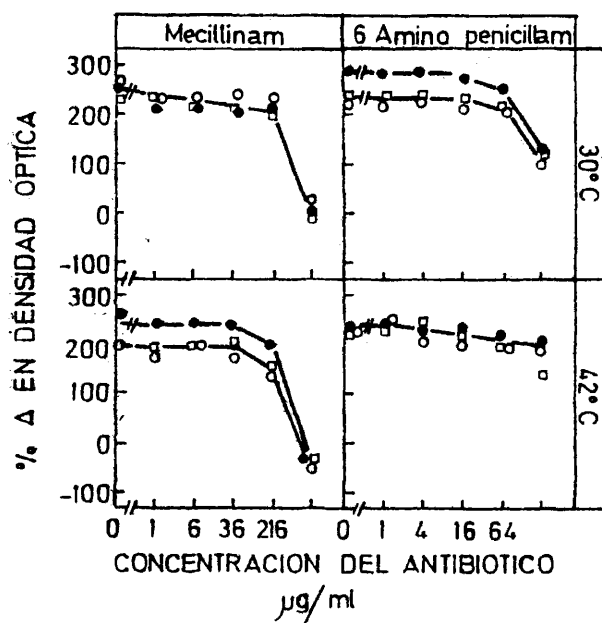
Cultivos de las distintas estirpes en fase de crecimiento exponencial en LBT<sub>20</sub> a 30°C fueron subdivididos en alícuotas a las que se añadieron diversos antibióticos a distintas concentraciones. Las alícuotas se continuaron incubando a 30°C o bien se transfirieron a 42°C en el mismo momento de la adición de los antibióticos. La densidad óptica a 450 nm se midió en el momento de la adición de los antibióticos y 90 ó 50 minutos después en los cultivos incubados a 30°C ó 42°C respectivamente. El incremento en la D.O. se calculó según la ecuación:

$$D.O. = \left( \frac{D.O. \text{ final}}{D.O. \text{ inicial}} - 1 \right) \times 100$$

Con objeto de poder comparar los efectos de los antibióticos a distintas concentraciones se representa también el incremento obtenido por los cultivos a los que no se añadió antibiótico. □, OV-2; ●, D-2; ○, D-3. La D.O. inicial fue, en todos los casos, de 0.08 U.A.



**Figura 24** ACCION DE LA CEFALORIDINA Y DE LA CEFALEXINA SOBRE LAS ESTIRPES  
OV-2, D-2 Y D-3  
Ver la leyenda de la figura 23



**Figura 25** ACCION DEL MECILLINAM Y DEL ACIDO 6-AMINO-PENICILANICO SOBRE LAS  
ESTIRPES OV-2, D-2 Y D-3  
Ver la leyenda de la figura 23



#### 4.2 RELACION ENTRE LA PROTEINA FtsA Y LA PROTEINA DE TERMINACION

##### 4.2.1 Alineamiento cromosómico

Gran parte de los resultados de este trabajo se han conseguido del estudio de poblaciones celulares a las que se había sincronizado la replicación.

Este proceso, clásico en el estudio de los ciclos de replicación y división bacteriana, consta de varias fases, al término de las cuales todos los cromosomas del cultivo se encuentran preparados para iniciar la replicación desde ori C (el origen de replicación), es decir, todos los cromosomas de la población se encuentran "alineados". Hay que hacer notar que estos tratamientos sincronizan la replicación pero no otros procesos celulares, particularmente hacemos notar que la división celular no se sincroniza. Asimismo, la masa y longitudes celulares varían entre las células del cultivo como si de una población en fase de crecimiento exponencial se tratara. Por ello preferimos denominar a este tratamiento alineamiento cromosómico y no sincronización.

El procedimiento de alineamiento cromosómico se describió en el apartado 3.8, razón por la cual solo se comentarán a continuación los aspectos teóricos del proceso.

En resumen, el proceso de alineamiento cromosómico, que se esquematiza en la figura 26, es el siguiente:

- 1.- Inhibición de la síntesis de proteínas. A su término todas aquellas células de la población que se encontraban al inicio del tratamiento replicando su cromosoma, habrán duplicado su material genético pero no habrán podido dividirse al no haber podido sintetizar las proteínas necesarias para la división. Tampoco habrán podido iniciar nuevas rondas de replicación al estar inhibida la síntesis de proteínas y no haber podido alcanzar la masa de iniciación.
- 2.- Inhibición de la síntesis de DNA. A su término todas las cé-

lulas de la población habrán adquirido la masa de iniciación y habrán sintetizado todas las proteínas necesarias para la replicación y para la división, excepto la proteína de terminación, pero no habrán replicado por faltarles un precursor del DNA.

3.- Desinhibición de la síntesis de DNA. Al comienzo de este período todos los cromosomas de la población se encuentran alineados en su origen. Al ser desinhibida la síntesis de DNA comenzará de una manera sincrónica la replicación en todas las células del cultivo. La división ocurrirá al término de la replicación y después de la síntesis y acción de la proteína de terminación.

Un tratamiento que se puede realizar a una población con sus cromosomas alineados en la iniciación de la replicación es el de inhibir la síntesis de proteínas en el mismo momento en que se desinhibe la síntesis de DNA. En estas condiciones la replicación comenzará y continuará hasta su término. Al estar inhibida la síntesis de proteínas no se habrá producido la proteína de terminación, quedando, por tanto, bloqueada la división celular. Para que esta ocurra, habrá que desinhibir de nuevo la síntesis de proteínas tras la cual se sintetizará y actuará la proteína de terminación, transcurriendo solo un pequeño lapso de tiempo (aproximadamente 5 minutos) para que se reanude la división celular.

La figura 27 muestra el curso de aumento en masa y número de partículas seguido por OV-2, D-2 y D-3 durante un tratamiento de alineamiento cromosómico. La velocidad de replicación durante la fase inhibitoria de la síntesis de proteínas decae hasta un valor próximo a 0 tal como era de esperar (figura 28). Los resultados se ajustan a lo esperado para una población con las siguientes características:

$$\begin{aligned} \tau &= 45 \text{ min} \\ C &= 60 \text{ min} \\ D &= 15 \text{ min} \end{aligned}$$

El ciclo celular de una bacteria con las anteriores características se muestra en la figura 29.



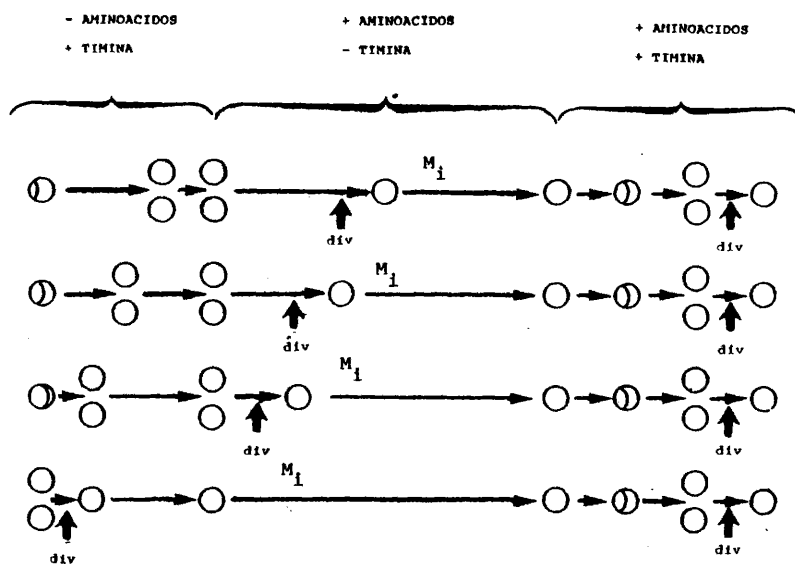
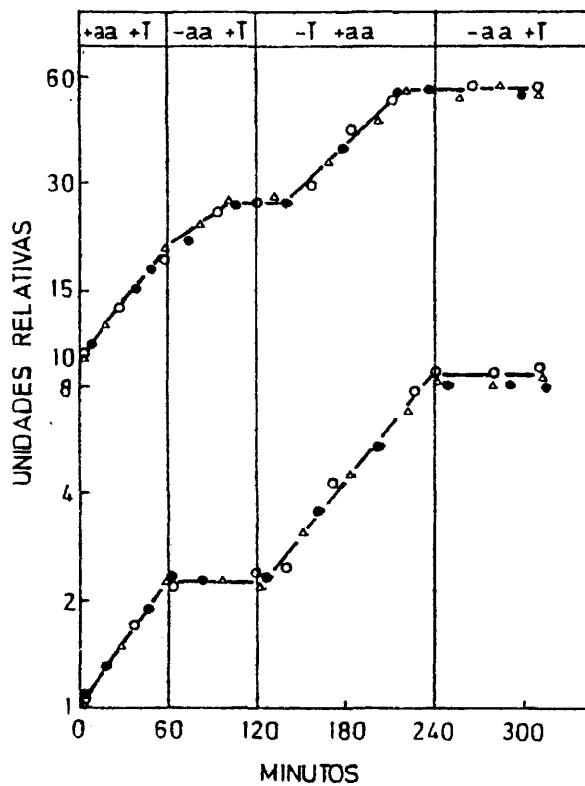


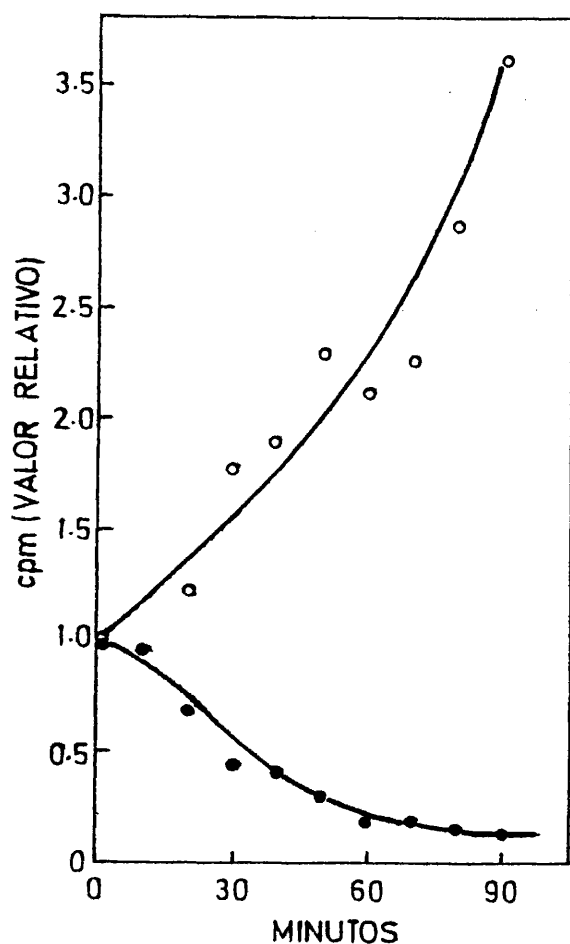
Figura 26 ALINEAMIENTO CROMOSOMICO

En este esquema se representa la marcha teórica de la replicación en varios cromosomas (  $\bigcirc$  ), que al iniciar el tratamiento se encontraban en distintas fases de su replicación, a lo largo de un alineamiento cromosómico. En ausencia de aminoácidos terminarán las rondas de replicación en marcha, pero no se iniciarán otras nuevas. Las células que en el momento de la inhibición de la síntesis de proteínas estuviesen en el período D podrán dividirse (momento indicado por una flecha y las siglas "div"). Al añadir de nuevo los aminoácidos al medio de cultivo y eliminar de éste la timina, las células de la población que tuviesen su cromosoma replicado podrán dividirse y continuar creciendo, posteriormente alcanzando la masa de iniciación todas ellas, pero no podrán iniciar la síntesis de DNA al faltarles un precursor. En el momento en que se les suministre timina, todas las células del cultivo (que se encontraban con sus cromosomas alineados en el origen) comenzarán sincrónicamente su replicación, dividiéndose cuando ésta finalice y actúe la proteína de terminación.



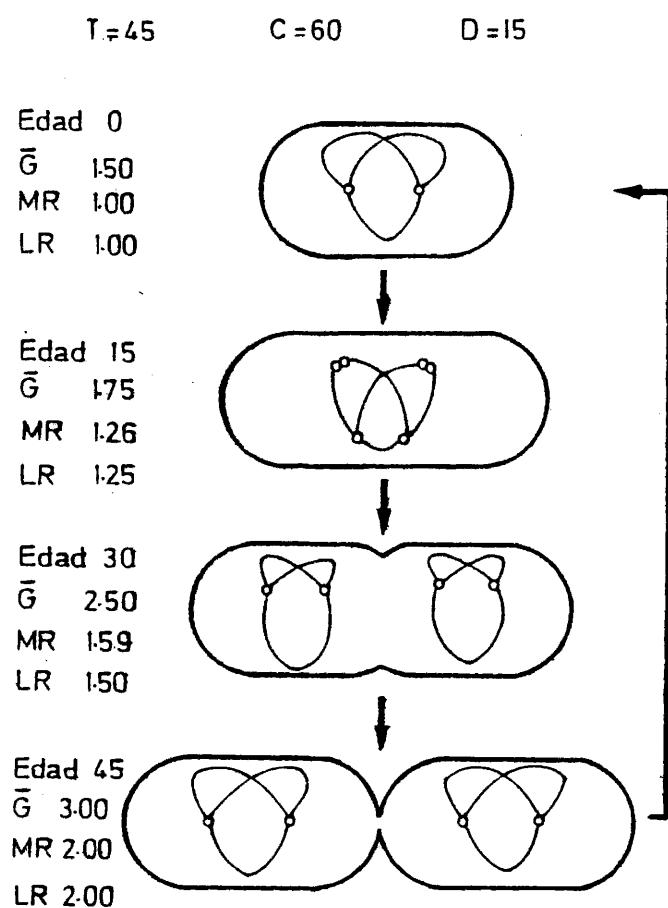
**Figura 27** ALINEAMIENTO CROMOSOMICO SEGUIDO DE UNA INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN OV-2, D-2 Y D-3

A un cultivo en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C se le inhibió la síntesis de proteínas, por medio de privación de aminoácidos al medio de cultivo, en el minuto 60. En el minuto 120 se desbloqueó la síntesis de proteínas y se inhibió la síntesis de DNA, por medio de ayuno de timina, hasta el minuto 240. A continuación se desinhibió la síntesis de DNA inhibiéndose simultáneamente, por medio de ayuno de aminoácidos, la síntesis de proteínas. Durante todo el proceso se siguió la D.O.<sub>450</sub> (curva inferior) y el n° de células (curva superior).  $\Delta$ , OV-2;  $\bullet$ , D-2;  $\circ$ , D-3. Los valores iniciales al comienzo del tratamiento fueron:  $1.80 \times 10^7$  part/ml y 0.103 U.A. (OV-2);  $1.44 \times 10^7$  part/ml y 0.074 U.A. (D-2);  $1.45 \times 10^7$  part/ml y 0.110 U.A. (D-3).



**Figura 28** INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA DURANTE UN AYUNO DE AMINOACIDOS

Un cultivo de D-3 en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C fue privado, mediante filtración, de todos los aminoácidos (●). A una alícuota de este cultivo se le añadieron todos los aminoácidos en el mismo momento (○). Se siguió la velocidad de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina a los tiempos indicados en ambos cultivos por medio de pulsos de 5 minutos de duración. El valor inicial fue de 8430 cpm.



**Figura 29** CICLO CELULAR TEORICO

Ciclo celular teórico de una bacteria con un tiempo de generación de 45 minutos, un tiempo de replicación de 60 minutos y un período  $D$  de 15 minutos. Se expresa para cada edad el número de equivalentes genómicos por célula ( $\bar{G}$ ), la masa relativa (MR) calculada según un modelo de crecimiento exponencial y la longitud relativa (LR) calculada según un modelo de crecimiento lineal con una duplicación al comienzo de  $D$ .

#### 4.2.2 Localización de la acción de la proteína FtsA en relación con el ciclo de replicación

La proteína FtsA, en base a resultados obtenidos en esta tesis, parece actuar durante los últimos 20 minutos del ciclo de división. Si esto fuese así, su acción coincidiría con las últimas fases del ciclo replicativo. La necesidad de un corto pulso de síntesis de DNA para que se sintetice la proteína FtsA parece relacionar los ciclos de replicación y de división celular.

Para poder localizar la acción de la proteína FtsA en relación con el ciclo de replicación se efectuó un alineamiento cromosómico según el proceso descrito en el apartado anterior. Al término del proceso de alineamiento todas las células se encuentran con su cromosoma sin replicar, con una masa igual o superior a la masa de iniciación y con todas las proteínas necesarias para la división excepto la proteína de terminación. En el momento de la desinhibición de la síntesis de DNA (adición de timina al medio de cultivo) comenzará la replicación de una manera sincrónica en todas las células, ocurriendo la división 40 minutos después (figuras 30 y 31). Si en el momento de la adición de timina se transfiere el cultivo a 42°C la división queda inhibida en las estirpes mutantes D-2 y D-3 ya que la proteína FtsA queda inactivada tras su síntesis. Si en vez de una incubación continuada a 42°C se dan pulsos de 10 minutos de duración a la temperatura restrictiva, a distintos tiempos a partir de la adición de timina, se puede observar lo siguiente.

1.- La división de D-3 no presenta retraso si el retorno a 30°C ocurre 20 minutos antes del comienzo de la división en la población control, produciéndose retraso si el retorno a la temperatura permisiva se realiza 10 minutos o menos antes de dicha recuperación (figura 30).

2.- La división de D-2 no presenta retraso si el retorno a 30°C ocurre 25 minutos antes del comienzo de la división en la población control, produciéndose retraso si dicho retorno se realiza

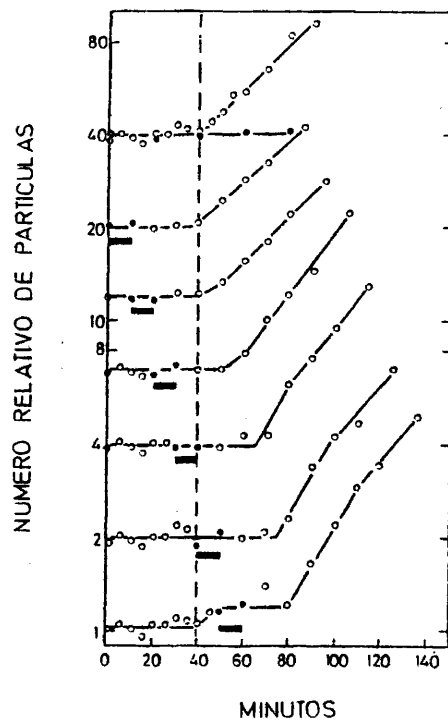
15 minutos o menos antes de la división (figura 31).

De estos resultados puede deducirse que la acción de la proteína FtsA ocurre, o al menos puede ocurrir, durante las etapas finales del ciclo de replicación.

#### 4.2.3 Diferencias en el período de síntesis y acción de la proteína de terminación entre las estirpes OV-2 y D-3

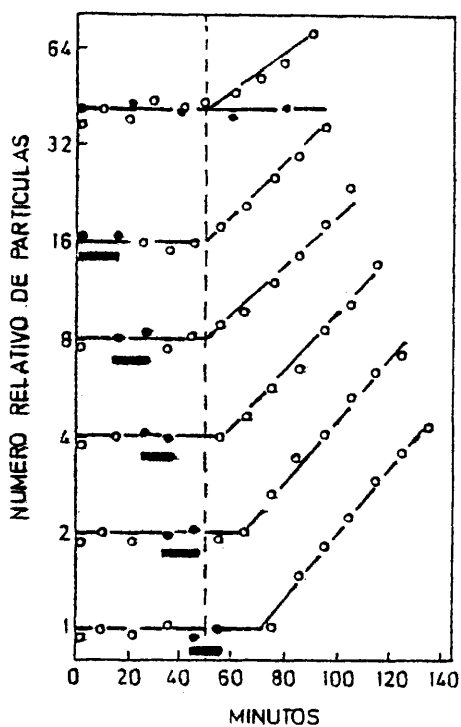
Los resultados obtenidos hasta ahora indican una relación entre la proteína FtsA, la replicación del cromosoma bacteriano y la división celular. Parece probable, por tanto, que pueda existir algún tipo de relación entre la proteína producto del gen ftsA y la proteína de terminación.

Para el estudio de las posibles relaciones se diseñó un tratamiento similar al de alineamiento cromosómico ya descrito, con la variación de invertir el orden de las inhibiciones. Es decir, a un cultivo en fase de crecimiento exponencial se le inhibió primeramente la síntesis de DNA durante 160 minutos, inhibiéndose a continuación y durante 60 minutos la síntesis de proteínas (en este segundo tratamiento se desbloqueó la síntesis de DNA). Si a un cultivo en fase de crecimiento exponencial se le inhibe la síntesis de DNA por medio de un ayuno de timina se producirá una división residual de aproximadamente el 90% seguida de una detención en el incremento en el número de células. Ello es debido a que todas las células que se encontraran el período D se dividirán. Asimismo, debido a la existencia de un contenido interno de timina, parte de las células de la población podrán finalizar su período de replicación y posteriormente dividirse. La síntesis de DNA llegará un momento en que se detenga debido a la ausencia de timina en el medio de cultivo (recuérdese que las estirpes utilizadas son auxótrofas para la timina) con lo que la división celular quedará bloqueada. Por otra parte durante el período inhibitorio de la replicación la síntesis de proteínas procederá normalmente resultando en un aumento considerable de la masa media celular. Al término del proceso inhibitorio, si



**Figura 30** EFECTO DE LA TEMPERATURA RESTRICTIVA SOBRE LA CINETICA DE DIVISION DE UNA POBLACION DE D-3 CON SUS CROMOSOMAS ALINEADOS

Una población de D-3 con sus cromosomas alineados se subdividió en varias alícuotas al término del alineamiento cromosómico ( $t=0$ ). En dicho momento se añadió timina al medio (20  $\mu\text{g/ml}$ ) a todas las alícuotas. Una de ellas se continuó incubando a 30°C (○, curva superior), otra se transfirió a 42°C (●, curva superior). Otras alícuotas fueron transferidas a 42°C durante 10 minutos a distintos tiempos, indicándose el tiempo de incubación a 42°C por una barra. Se siguió la cinética de aumento en partículas en todos los casos. La línea discontinua vertical marca el principio de la división del cultivo control a 30°C. El valor inicial fue de  $2.7 \times 10^7$  part/ml. Para poder comparar todas las curvas, los valores iniciales han sido multiplicados por factores convenientes.



**Figura 31** EFECTO DE LA TEMPERATURA RESTRICTIVA SOBRE LA CINETICA DE DIVISION DE UNA POBLACION DE D-2 CON SUS CROMOSOMAS ALINEADOS

Una población de D-2 con sus cromosomas alineados se subdividió en varias alícuotas al término del alineamiento cromosómico ( $t=0$ ). En dicho momento se añadió timina al medio (20  $\mu\text{g/ml}$ ) a todas las alícuotas. Una de ellas se continuó incubando a 30°C (○, curva superior), otra se transfirió a 42°C (●, curva superior). Otras alícuotas fueron transferidas a 42°C durante 10 minutos a distintos tiempos, indicándose el tiempo de incubación a 42°C por una barra. Se siguió la cinética de aumento en partículas en todos los casos. La línea discontinua vertical marca el principio de la división del cultivo control a 30°C. El valor inicial fue de  $8.5 \times 10^7$  part/ml. Para poder comparar todas las curvas los valores iniciales han sido multiplicados por factores convenientes.

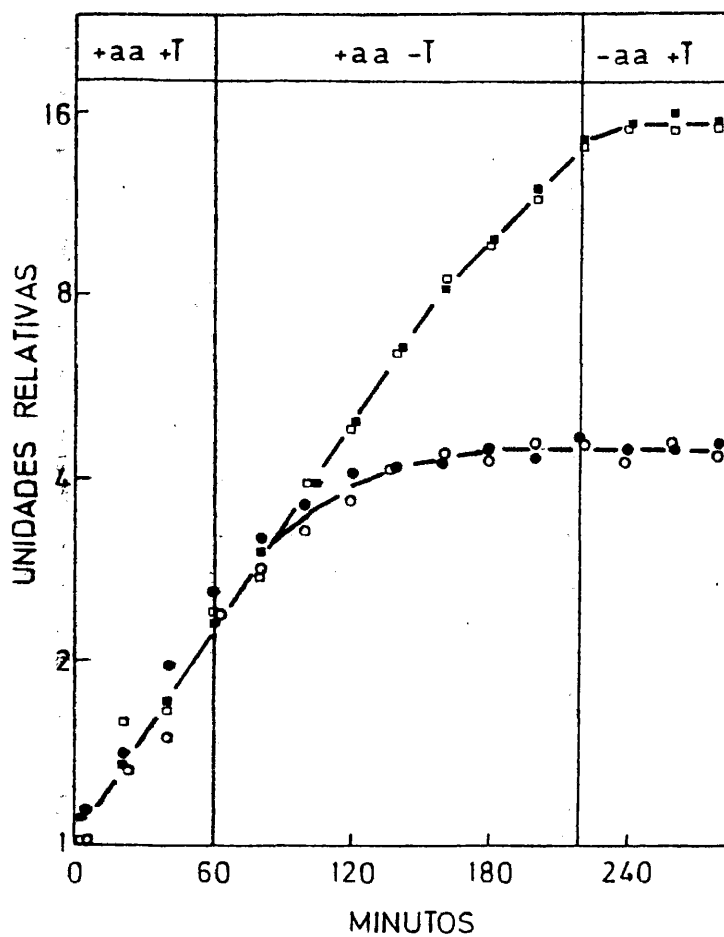


este es lo suficientemente largo, todas las células de la población habrán alcanzado la masa de iniciación, habrán sintetizado todas las proteínas necesarias para la replicación (no pudiendo ocurrir ésta por estar en condiciones de ausencia de timina) y finalmente, habrán sintetizado todas las proteínas necesarias para la división excepto la proteína de terminación. Si a continuación añadimos timina al medio e inhibimos la síntesis de proteínas, comenzará la replicación que proseguirá hasta su término. En este punto, todas las células de la población poseerán todos los requerimientos para su división excepto la teórica proteína de terminación. Por tanto, si desinhibimos la síntesis de proteínas, se sintetizará la proteína de terminación y según los datos de Jones y Donachie (80) 5 minutos después deberá producirse la división.

El desarrollo del tratamiento, realizado a 30°C, para OV-2 y D-3 hasta el momento de la desinhibición de la síntesis de proteínas se muestra en la fig. 32, coincidiendo los resultados con los expresados, es decir durante la fase de inhibición de la replicación, el aumento en masa sigue de una manera exponencial mientras que el número de partículas se detiene tras una división residual elevada. Durante la inhibición de la síntesis de proteínas se detienen tanto el aumento en masa como en número de partículas.

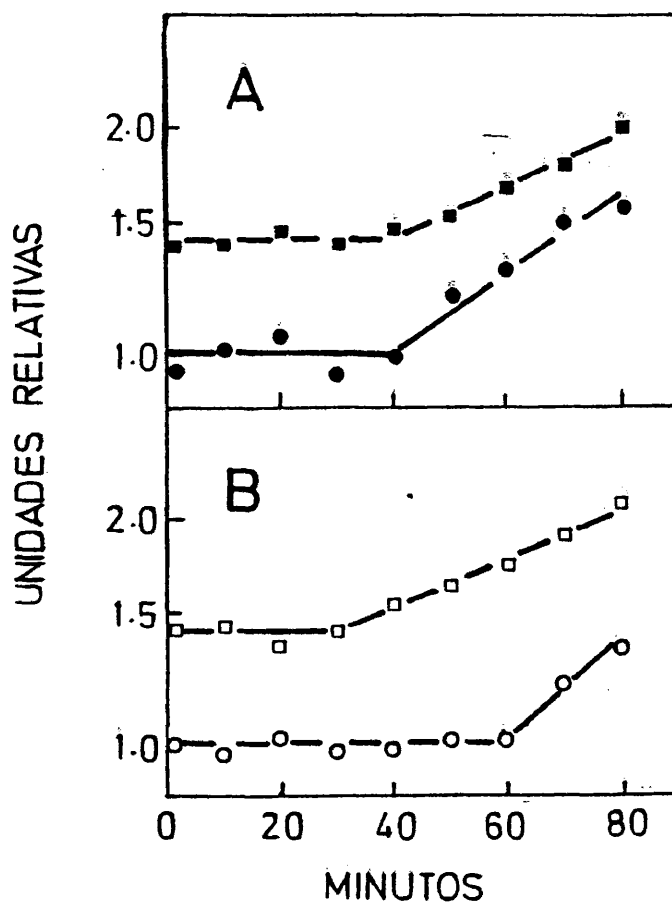
En la figura 33 se muestra la cinética de aumento en masa y de número de células de las estirpes OV-2 y D-3 tras ser desinhibida la síntesis de proteínas a cultivos pretratados de la manera anteriormente descrita.

En la figura 33-A se puede observar la cinética de aumento en masa y en número de células en OV-2. Es importante destacar que la recuperación del aumento en masa, y por tanto de síntesis de proteínas, tarda aproximadamente 40 minutos. La recuperación de la división en OV-2 es simultánea a la recuperación de síntesis de proteínas, tal como es de esperar. En la figura 33-B se muestran los resultados experimentales obtenidos en D-3. Podemos



**Figura 32** ALINEAMIENTO CROMOSOMICO INVERSO DE OV-2 Y DE D-3

Un cultivo en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C fue privado de timina en el minuto 60. En el minuto 220 fue privado de aminoácidos al tiempo que se le añadía timina (20 µg/ml). Se siguieron las cinéticas de aumento en masa (■, D-3; □, OV-2) y en número de partículas (●, D-3; ○, OV-2). Los valores iniciales fueron de 0.05 U.A. y de  $7.2 \times 10^7$  part/ml para D-3 y de 0.05 U.A. y  $9.0 \times 10^6$  part/ml para OV-2.



**Figura 33** CINÉTICAS DE RECUPERACION DE LA MASA Y DE LA DIVISION EN OV-2 Y D-3 A 30°C DESPUES DE UN ALINEAMIENTO CROMOSOMICO INVERSO

Cultivos de OV-2 o de D-3 en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C fueron sometidos a un alineamiento cromosómico inverso. Al término de éste se permitió la síntesis de proteínas (minuto 0) y se siguieron las cinéticas de aumento en masa (símbolos cuadrados) y en número de partículas (símbolos redondos). A, OV-2; B, D-3. Los valores iniciales fueron de 0.371 U.A. y  $2.27 \times 10^7$  part/ml para OV-2 y de 0.533 U.A. y  $2.81 \times 10^7$  part/ml para D-3.

observar que la masa se recupera a los 35 minutos de la desinhibición de la síntesis de proteínas mientras que la división comienza a los 60, es decir, 25 minutos después.

OV-2 y D-3 presentaron un comportamiento aparentemente igual durante el pretratamiento (fases inhibitorias de la síntesis de DNA y de proteínas): sus cinéticas de aumento en masa y en partículas son idénticas (figura 32). Si la proteína FtsA y la proteína de terminación no tuviesen ninguna relación se esperaría que la recuperación de la división al término del tratamiento fuese también idéntica, es decir que ocurriese al mismo tiempo en las estirpes parental y mutante (recuérdese que, teóricamente, al término del tratamiento descrito, todas las células presentan todos los requerimientos para su división cumplidas excepto la síntesis y acción de la proteína de terminación). Sin embargo, se observa un desfase de 25 minutos entre la reanudación de la división en la estirpe parental, OV-2, y la estirpe mutante, D-3. Esto sugiere la existencia de una relación entre las proteínas FtsA y la llamada proteína de terminación.

#### 4.2.4 La proteína FtsA se comporta como una proteína de terminación

Los resultados del apartado anterior sugerían la existencia de una relación entre la proteína FtsA y la proteína de terminación en base a las diferencias observadas en el tiempo de síntesis y acción de la proteína de terminación entre las estirpes OV-2 y D-3. Para poder profundizar más en las posibles relaciones existentes entre ambas proteínas se procedió a estudiar el comportamiento de las estirpes parental y mutantes después de un tratamiento igual al que permitió a Jones y Donachie (80) elaborar la hipótesis de la proteína de terminación.

Si a una población celular con los cromosomas alineados en el origen por efecto de un tratamiento de alineamiento cromosómico (ver apartado 4.2.1) se le inhibe la síntesis de proteínas en el mismo momento en que se desbloquea la síntesis de DNA, la replicación comenzará de una manera sincrónica en todas las células.

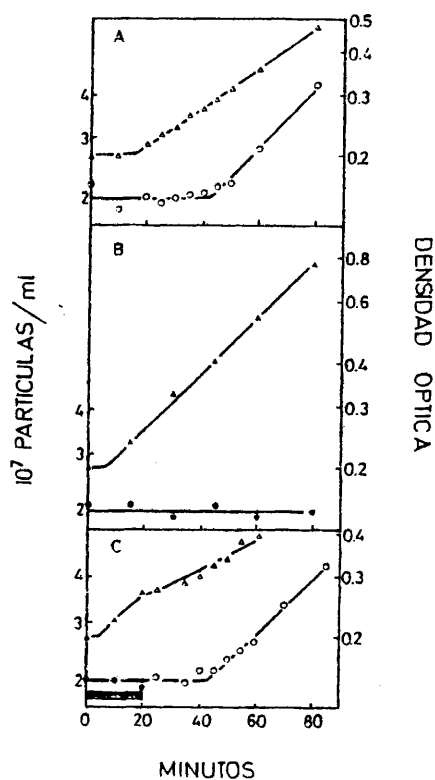
las de la población y seguirá su curso hasta la finalización que, lógicamente, también será sincrónica. Las células de cultivo no podrán dividirse al no poder sintetizar la proteína de terminación (por estar inhibida la síntesis de proteínas). Una vez ha finalizado la replicación todas las células poseerán todos los requerimientos para su división excepto la síntesis y acción de la proteína de terminación. Si a continuación se desinhibe la síntesis de proteínas, la proteína de terminación se sintetizará y actuará reiniciándose la división.

En las figuras 34 y 35 se muestra el comportamiento de D-3 y de D-2 después de ser desbloqueada la síntesis de proteínas en cultivos con todos los requerimientos para la división cumplidos excepto la proteína de terminación. Como se puede observar en las figuras 35-A y 36-A la densidad óptica de los cultivos de D-3 y de D-2 tarda aproximadamente 20 minutos en recuperarse, mientras que la división se reanuda a los 45 minutos en el caso de D-3 y a los 30 minutos en el caso de D-2. Dicha reanudación es sensible a la temperatura. En efecto, si en el momento en que se desinhibe la síntesis de proteínas se transfieren los cultivos de D-3 o de D-2 a la temperatura restrictiva ocurre lo siguiente (figuras 34-B y 35-B).

- 1.- Reanudación inmediata del aumento en masa.
- 2.- Inhibición total de la división.

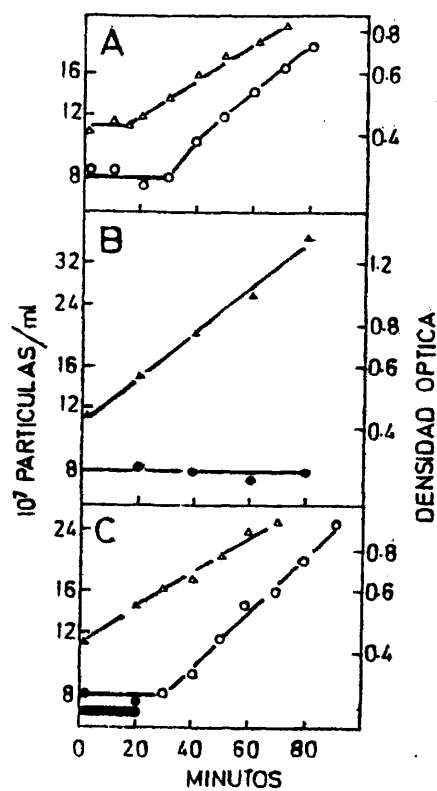
Estos resultados indican que la proteína FtsA se comporta como una proteína de terminación. En efecto, la proteína de terminación es el único requerimiento para que se dividan las células en las condiciones descritas. Para que ocurra la división, en estas condiciones y según mostraron Jones y Donachie (80) es necesaria solamente la síntesis y acción de la proteína de terminación. Por tanto, al quedar inhibida la división por acción de la temperatura restrictiva se deduce que la proteína FtsA es una proteína de terminación.

Si la proteína FtsA no fuese una proteína de terminación



**Figura 34** CAPACIDAD DE D-3 PARA DIVIDIRSE A 30°C Y 42°C DESPUES DE QUE SE HAYAN COMPLETADO TODOS LOS REQUERIMIENTOS PARA LA DIVISION EXCEPTO LA PROTEINA DE TERMINACION

Un cultivo de D-3 a 30°C fue sometido a un tratamiento de alineamiento cromosómico seguido de una inhibición de la síntesis de proteínas en presencia de síntesis de DNA de una duración de 70 minutos. En el minuto 0 se desinhibió la síntesis de proteínas por medio de la adición de todos los aminoácidos requeridos así como de 5 mg/ml de casaaminoácidos. Se siguieron las cinéticas de aumento en masa (triangulos) y en número de partículas (círculos) en las siguientes condiciones: A, incubación a 30°C; B, incubación a 42°C; C, pulso de 42°C durante el período indicado por la barra y posterior transferencia a 30°C.



**Figura 35** CAPACIDAD DE D-2 PARA DIVIDIRSE A 30°C Y 42°C DESPUES DE QUE SE HAYAN COMPLETADO TODOS LOS REQUERIMIENTOS PARA LA DIVISION EXCEPTO LA PROTEINA DE TERMINACION

Un cultivo de D-2 a 30°C fue sometido a un tratamiento de alineamiento cromosómico seguido de una inhibición de la síntesis de proteínas en presencia de síntesis de DNA de una duración de 70 minutos. En el minuto 0 se desinhibió la síntesis de proteínas por medio de la adición de todos los aminoácidos requeridos así como de 5 mg /ml de casaaminoácidos. Se siguieron las cinéticas de aumento en masa (triángulos) y en número de partículas (círculos) en las siguientes condiciones: A, incubación a 30°C; B, incubación a 42°C; C, pulso de 42°C durante el período indicado por la barra y posterior transferencia a 30°C.

se debería haber producido una división residual del orden del 100% a la temperatura restrictiva ya que la proteína FtsA habría sido sintetizada y habría ejercido su acción durante el proceso de alineamiento cromosómico y/o el período inhibitorio de síntesis de proteínas subsiguiente. En este caso, la temperatura restrictiva no habría bloqueado una ronda de divisiones celulares.

La temperatura restrictiva inhibe totalmente la división. Sin embargo, si el cultivo se transfiere a condiciones permisivas después de 20 minutos de incubación a 42°C la división se reanuda normalmente después de 20 minutos en el caso de D-3 o de 10 minutos en el caso de D-2 (figuras 34-C y 35-C). Esto nos permite tener un control positivo del experimento para demostrar que la ausencia de división no es un artefacto producido por una disminución progresiva de la viabilidad celular como consecuencia de todos los tratamientos sufridos.

#### 4.2.5 Período de síntesis y acción de la proteína de terminación: diferencias existentes entre las estirpes OV-2, D-2 y D-3

El período de síntesis y acción de la proteína de terminación es de aproximadamente 5 minutos según observaron Jones y Donachie (80). En nuestras estirpes mutantes el período de síntesis y acción de la proteína FtsA es de 25 minutos en D-3 y la acción es de 10 minutos en D-2. Si la proteína FtsA es una proteína de terminación, como se deduce del apartado 4.2.4, el período de síntesis y acción de la proteína de terminación debe alargarse en las estirpes mutantes más allá de los 5 minutos descritos (80).

Para comprobar este aspecto se realizó, a la temperatura permisiva, un alineamiento cromosómico seguido de una inhibición de la síntesis de proteínas durante 70 minutos. Al término, todas las células de la población presentan todos los requerimientos para la división cumplidos, excepto la proteína de terminación. Este tratamiento se realizó con las estirpes OV-2 a 30°C y 37°C (temperatura óptima para *E.coli*) y con D-2 y D-3 a 30°C. Tras la



desinhibición de la síntesis de proteínas se analizaron las cinéticas de aumento en masa y en partículas (figuras 36 y 37).

Los resultados obtenidos indican:

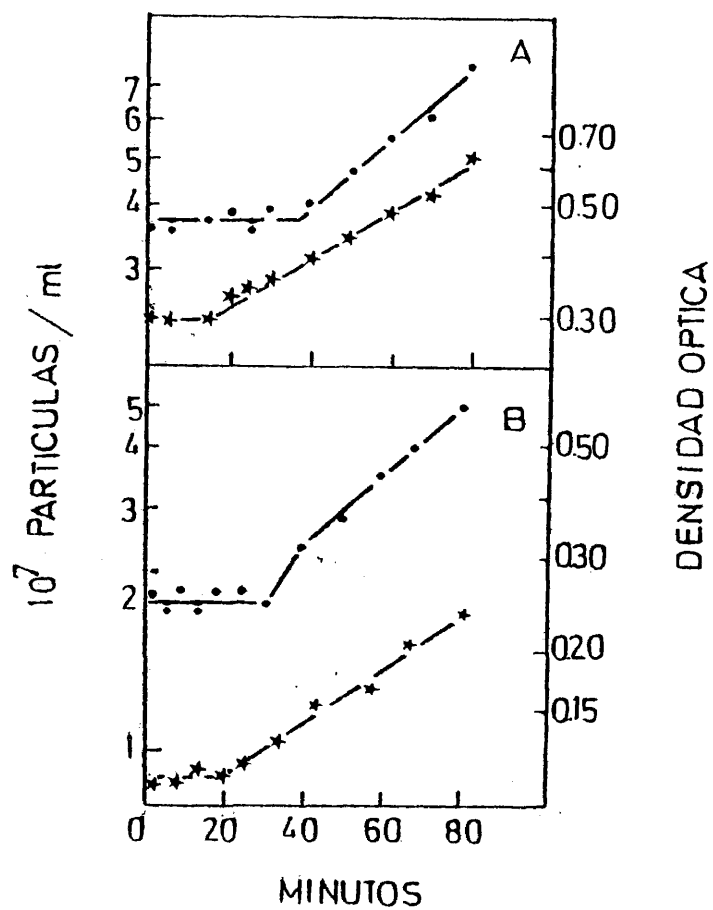
- 1.- A ambas temperaturas en OV-2 y a 30°C en D-2 y D-3, la recuperación de la densidad óptica ocurre a los 20 minutos de finalizar el tratamiento.
- 2.- A ambas temperaturas el desfase entre la recuperación de la densidad óptica y la reanudación de la división es de 5 minutos en la estirpe OV-2, de 25 minutos en D-3 y de 10 minutos en D-2.

Los 5 minutos de desfase observados en OV-2 corresponden con las descritos por Jones y Donachie (80) para la síntesis y acción de la proteína de terminación. Este período se alarga a 25 minutos en D-3 y a 10 minutos en D-2. Parece esto indicar que la proteína FtsA o no es igual de activa o no se sintetiza en la misma cantidad, a la temperatura permisiva, en la estirpe salvaje OV-2 que en los mutantes D-2 y D-3.

#### 4.2.6 Necesidad de un pulso de síntesis de DNA para la inducción de la síntesis de la proteína de terminación

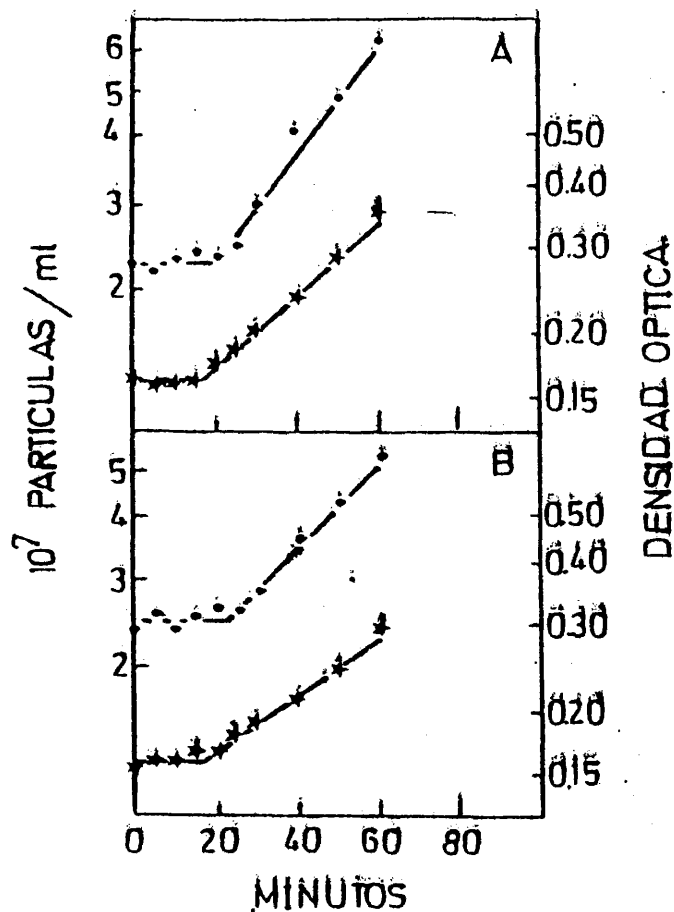
De apartados anteriores se ha podido concluir que la proteína FtsA podría ser una proteína de terminación. Por otra parte en el apartado 4.1.15 de Resultados se puede comprobar que para que haya síntesis de la proteína FtsA es necesaria la síntesis de DNA.

Para estudiar este aspecto se realizó un alineamiento cromosómico a poblaciones celulares de OV-2 en crecimiento exponencial a 30°C y 37°C. Se utilizó la estirpe OV-2 para que los resultados obtenidos no fuesen un posible efecto secundario de las mutaciones ftsA. Asimismo se realizó también a 37°C para que los resultados obtenidos no pudiesen ser achacados al empleo de temperaturas subóptimas.



**Figura 36** RECUPERACION DE LA DIVISION Y DEL CRECIMIENTO EN MASA EN D-2 Y EN D-3 A 30°C DESPUES DE QUE SE HAYAN COMPLETADO TODOS LOS REQUERIMIENTOS PARA LA DIVISION EXCEPTO LA PROTEINA DE TERMINACION

Un cultivo de D-2 o de D-3 en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C fue tratado para alinear sus cromosomas. Al término de este tratamiento se añadió timina al medio y se inhibió la síntesis de proteínas durante 70 minutos, al cabo de los cuales (minuto 0) se desinhibió dicha síntesis y se siguió la cinética de aumento en D.O.<sub>450</sub> (★) y en número de partículas (●). A, D-3; B, D-2.



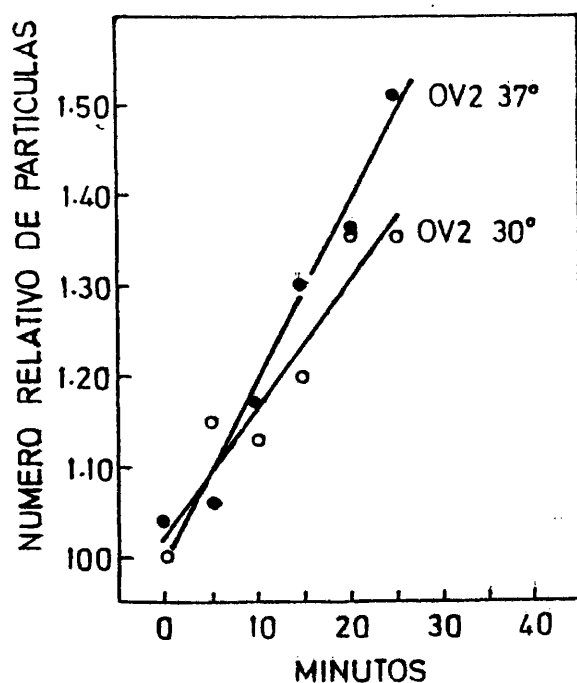
**Figura 37** RECUPERACION DE LA DIVISION Y DEL CRECIMIENTO EN MASA EN OV-2 DESPUES DE QUE SE HAYAN COMPLETADO TODOS LOS REQUERIMIENTOS PARA LA DIVISION EXCEPTO LA PROTEINA DE TERMINACION

Un cultivo de OV-2 enfase de crecimiento exponencial en M9R fue tratado para alinear sus cromosomas. Al término de este tratamiento se añadió tímica al medio y se inhibió la síntesis de proteínas durante 70 minutos. Al cabo de los cuales (minuto 0) se desinhibió dicha síntesis y se siguió la cinética de aumento en D.O. <sub>450</sub> (★) y en número de partículas (●). A, 37°C; B, 30°C.

Tras el alineamiento cromosómico (que tal como se describió consta de una inhibición de síntesis de proteínas seguida de una inhibición de síntesis de DNA) se procedió a inhibir nuevamente la síntesis de proteínas durante un periodo suficiente para que pudiera finalizar las rondas de replicación en marcha. Al término de este tratamiento (ver apartado 4.2.1 del capítulo de resultados) todas las células de la población sometidas a este proceso presentan todos los requerimientos necesarios para la división excepto la proteína de terminación que se sintetizará tan pronto como se desinhiba la síntesis de proteínas. Se estudió la recuperación de la división en condiciones inhibitorias de la síntesis de DNA por medio de la acción del ácido nalidíxico. Los resultados obtenidos se expresan en la figura 38. En ella se muestran el número relativo de células después de 80 minutos a partir de la adición de ácido nalidíxico frente al tiempo en que se añadió el inhibidor a partir de la desinhibición de la síntesis de proteínas. Los resultados indican que si se inhibe la síntesis de DNA a células que presentan todos los requerimientos para la división excepto la proteína de terminación esta no se sintetiza ya que no se produce división celular. Estos resultados indican que para que se sintetice la proteína de terminación hace falta un pulso de síntesis de DNA, tal como era de esperar en base a los resultados obtenidos anteriormente para la proteína FtsA.

#### 4.2.7 Caracter termosensible de la división en poblaciones celulares de D-2 y de D-3 con su periodo de replicación finalizado

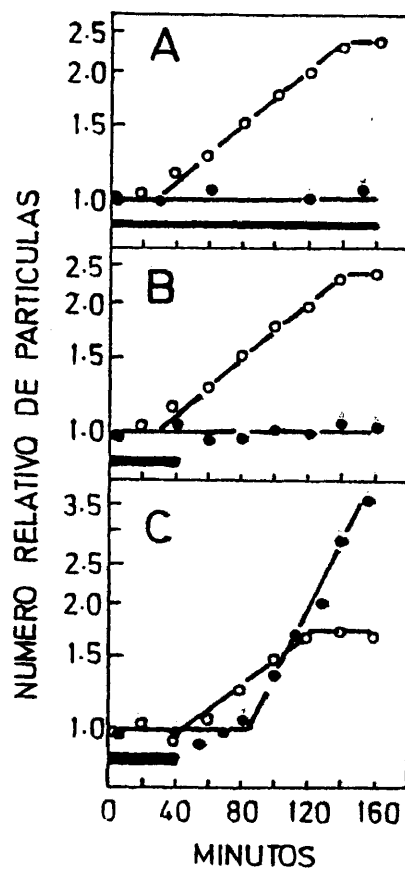
De todos los resultados obtenidos hasta ahora se puede concluir que la proteína producto del gen *ftsA* podría ser una proteína de terminación cuya síntesis sería inducida por una síntesis, específica o no, de DNA. Por tanto, si se inhibe la síntesis de proteínas a una población en crecimiento exponencial las rondas de replicación en marcha finalizarán pero la proteína FtsA no se sintetizará al no haber aminoácidos en el medio y por tanto, al ser dicha proteína necesaria para la división, no se podrán dividir las células. Si a continuación, es decir cuando las rondas de



**Figura 38** EFECTO DE LA INHIBICION DE LA SINTESIS DE DNA SOBRE LA DIVISION DE OV-2 DESPUES DE QUE SE HAYAN COMPLETADO TODOS LOS REQUERIMIENTOS PARA LA DIVISION EXCEPTO LA PROTEINA DE TERMINACION

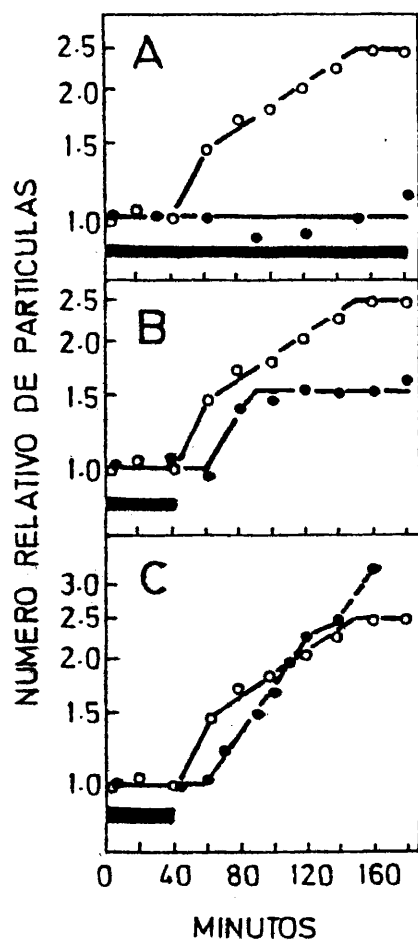
Un cultivo de OV-2 en fase de crecimiento exponencial a 30°C (○) ó 37°C (●) en M9R se sometió a un alineamiento cromosómico tras el cual se permitió la síntesis de DNA y se inhibió la síntesis de proteínas durante 70 minutos. Al término de este período (minuto 0) se dividieron los cultivos en alícuotas a las que se desinhibió la síntesis de proteínas. A partir del minuto 0 se añadió NA (80 µg/ml) a las alícuotas a distintos tiempos, midiéndose el incremento en el número de partículas a los 80 minutos de la adición del inhibidor. En ordenadas se representa el número relativo de partículas obtenido después de los 80 minutos y en abscisas el momento, después de la desinhibición de la síntesis de proteínas, en que se añadió el NA. Número inicial de part./ml,  $2.2 \times 10^7$  (37°C) ó  $2.4 \times 10^7$  (30°C).

replicación hayan finalizado, se desbloquea la síntesis de proteínas y se elimina la timina del medio de cultivo, se sintetizará la proteína FtsA y tras su acción se producirá división celular. Si en el momento de la desinhibición de la síntesis de proteínas transferimos el cultivo a la temperatura restrictiva, la división en los mutantes D-2 y D-3, quedara inhibida (figuras 39-A y 40-A) al quedar inactivada la proteína FtsA que haya sido sintetizada. Si retornamos el cultivo, tras 40 minutos de incubación a 42°C, a la temperatura permisiva se recupera la división en D-2 (ya que la proteína FtsA en esta estirpe tiene un carácter reversible) pero no en D-3 (ya que la proteína FtsA de esta estirpe no es reversible) (figuras 39-B y 40-B). Por otra parte si en el momento del retorno a 30°C se añade timina al medio, es decir, se permite que comience la síntesis de DNA, se recuperará la división tanto en D-2 como en D-3 (figuras 39-C y 40-C). En D-2 se recupera a los 20 minutos mientras que en D-3 la reanudación de la división se produce a los 50 minutos.



**Figura 39** EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE POBLACIONES DE D-3 CON SU PERIODO DE REPLICACION FINALIZADO

Un cultivo de D-3 en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C fue privado de aminoácidos durante 75 minutos, al cabo de los cuales (minuto 0) fueron suministrados de nuevo y se eliminó la timina del medio. A, 30°C (○) y 42°C (●); B, 30°C (○) y 42°C durante 40 minutos, indicados por la barra (●); C, 30°C y 42°C durante 40 minutos al cabo de los cuales se añadió timina al medio de cultivo (20 µg/ml) (●). El número inicial fue de  $1.4 \times 10^7$  part/ml.



**Figura 40** EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE POBLACIONES DE D-2 CON SU PERIODO DE REPLICACION FINALIZADO

Un cultivo de D-2 en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C fue privado de aminoácidos durante 75 minutos, al cabo de los cuales (minuto 0) fueron suministrados de nuevo y se eliminó la timina. A, 30°C (○) y 42°C (●); B, 30°C (○) y 42°C durante 40 minutos, indicados por la barra (●); C, 30°C y 42°C durante 40 minutos al cabo de los cuales se añadió timina al medio de cultivo (20 µg/ml) (●). El número inicial fue de  $1.9 \times 10^7$  part/ml.



### 4.3 RELACION ENTRE LOS PROCESOS DE REPLICACION DEL CROMOSOMA Y LA DIVISION CELULAR

#### 4.3.1 Necesidad de síntesis de DNA para que se reanude la división después de una inhibición de síntesis de proteínas en OV-2

Resultados anteriores indican que para que se sintetice la proteína FtsA hace falta una síntesis simultánea de DNA. Por otra parte durante la inhibición de la síntesis de proteínas en el proceso de alineamiento cromosómico se duplica el DNA y, lógicamente, no se sintetiza la proteína FtsA. Esta debe sintetizarse durante la fase de inhibición de síntesis de DNA ya que durante este período se produce división celular. Estos dos resultados son, aparentemente, contradictorios: o bien la proteína FtsA se sintetiza independientemente de que haya o no replicación o bien el tratamiento inhibitorio de la síntesis de DNA no es perfecto y se produce una replicación residual.

Tal como se vió en el apartado 4.1.9 la inhibición de la síntesis de DNA por medio de ayuno de timina parece un buen método ya que el porcentaje de divisiones residuales obtenidas es muy superior al esperado, implicando la existencia de un período D anormalmente largo y distinto al calculado según otros métodos. La adición de inhibidores tales como ácido nalidíxico inhibe inmediatamente la replicación celular, sin embargo al no ser reversible su acción, o al menos no inmediatamente reversible, no puede ser utilizado en el proceso de alineamiento cromosómico.

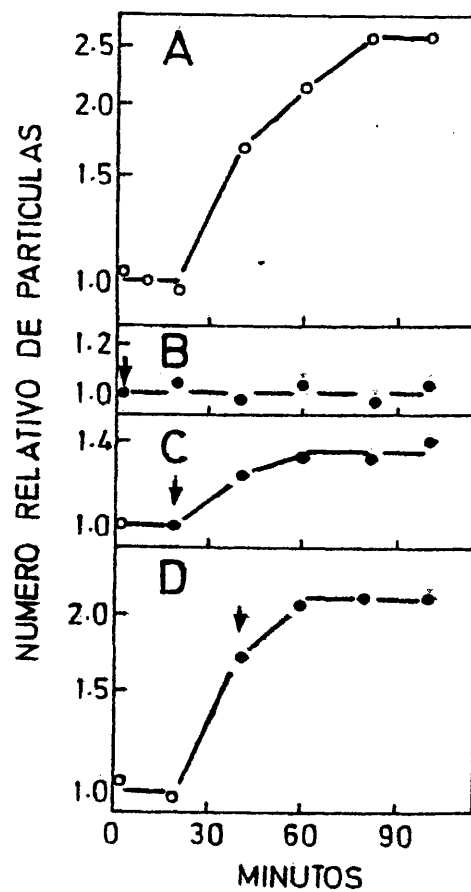
Para poder determinar si durante el tratamiento inhibitorio de síntesis de DNA se produce algo de replicación que pudiera inducir la síntesis de la proteína FtsA se realizaron diversos experimentos utilizando diversas maneras de inhibir la síntesis de DNA.

Para evitar posibles efectos de mutaciones secundarias se realizaron los distintos experimentos con OV-2 (estirpe paren-

tal) y no con D-2 y D-3. Además las temperaturas utilizadas fueron las de crecimiento de D-2 y D-3, es decir 30°C, y la temperatura óptima de crecimiento para E.coli, 37°C.

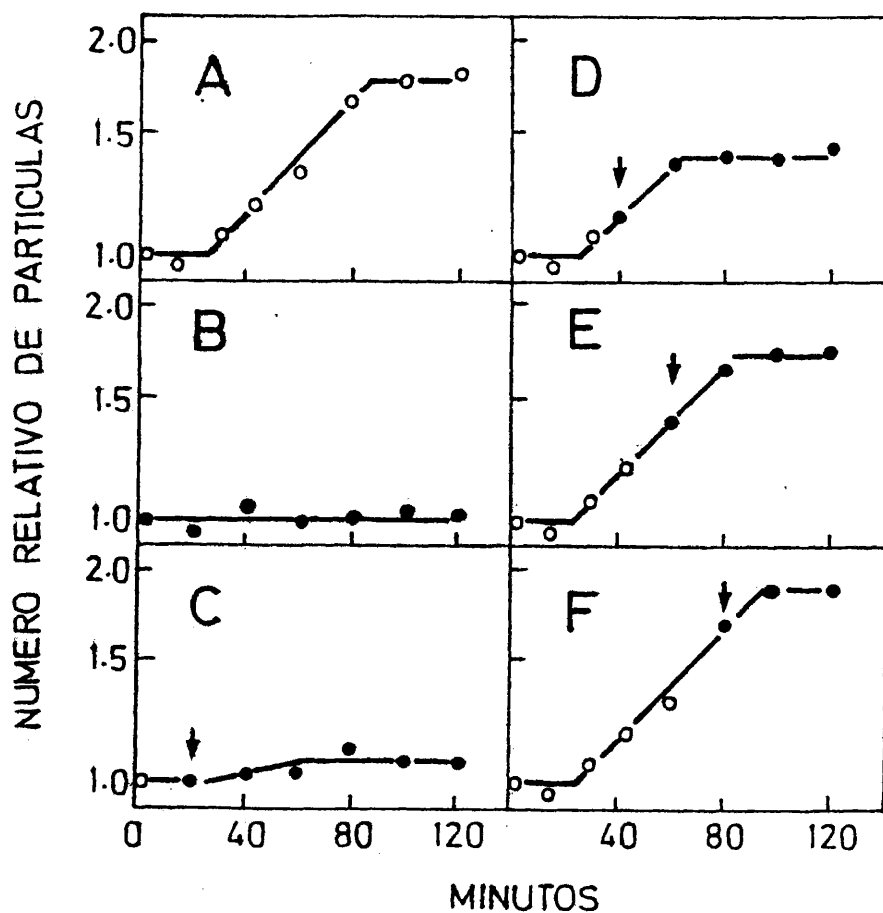
Cultivos en fase de crecimiento exponencial de OV-2 a los que se les había inhibido la síntesis de proteínas, por medio de un ayuno total de aminoácidos, durante un período nunca inferior a 1.5 r fueron subdivididos en varias alícuotas a las que se privó de timina en el mismo momento en que se desbloqueó la síntesis de proteínas. A partir de este momento se les añadió ácido nalidíxico a distintos tiempos. El estudio de la cinética de división de estos cultivos, tanto a 30°C como 37°C (figuras 41 y 42) muestran que si la síntesis de DNA es inhibida por medio de ácido nalidíxico en el mismo momento del desbloqueo de la síntesis de proteínas y comienzo del ayuno de timina no se produce división. Si la adición de ácido nalidíxico ocurre a tiempos mas tardíos se produce división residual.

Estos resultados sugieren que durante el ayuno de timina se produce una replicación residual que quedaría inhibida por efecto del ácido nalidíxico. Sin embargo, pudiera ser que la adición de ácido nalidíxico junto a ayuno de aminoácidos fuese un tratamiento muy drástico que tuviese como efecto secundario la inhibición de la división. Para poder determinar este punto se realizó una inhibición de la síntesis de proteínas, por ayuno de aminoácidos, a un cultivo en fase de crecimiento exponencial de OV-2 a 37°C. Tras 50 minutos se restauraron los aminoácidos al medio de cultivo, añadiendose ácido nalidíxico a distintos tiempos a partir de este momento. Los resultados (figura 43) muestran que si la inhibición de síntesis de DNA se produce en el mismo momento de la adición de aminoácidos al cultivo se produce una división residual mínima y de alrededor de un 10%. Este valor se puede considerar nulo en comparación con el 150% obtenido si la inhibición se produce por medio de ayuno de timina. Si el ácido nalidíxico es añadido más tarde, la división residual de la población va haciendose algo mas independiente de la inhibición de



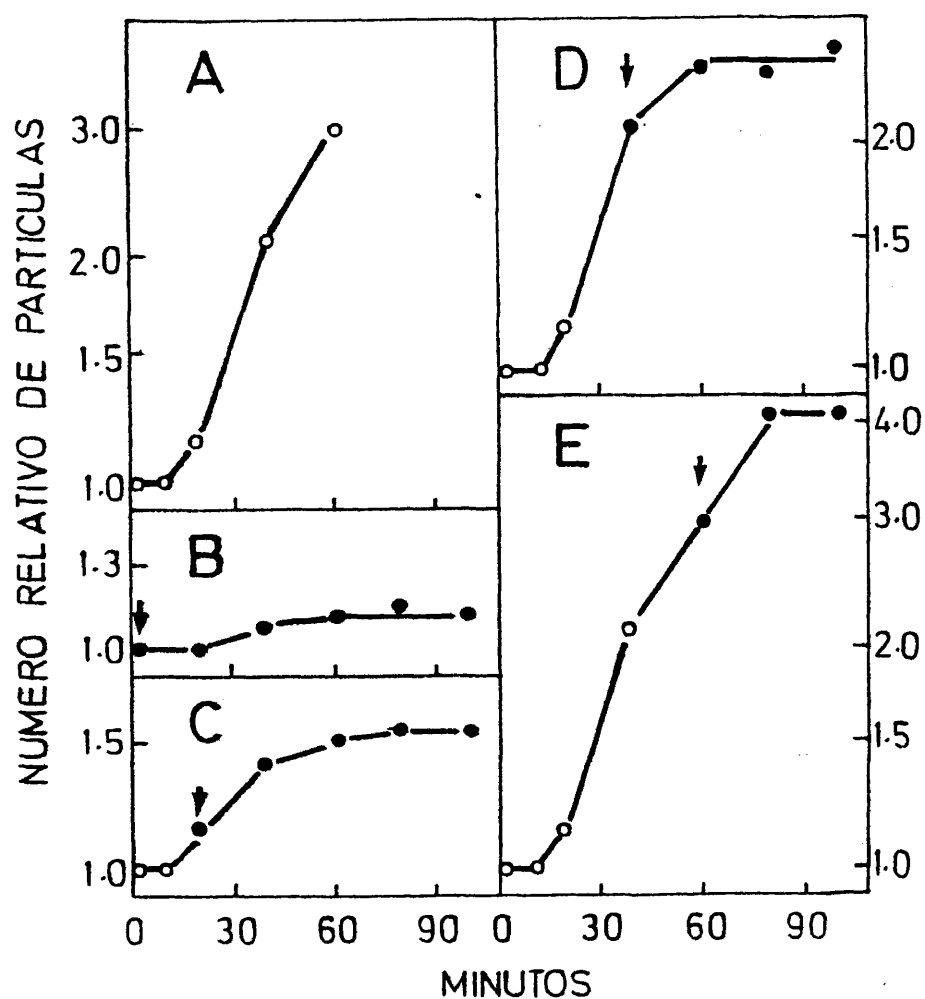
**Figura 41** EFECTO DE LA INHIBICION DE LA SINTESIS DE DNA SOBRE POBLACIONES DE OV-2 A 37°C CON SU PERIODO DE REPLICACION FINALIZADO

Un cultivo de OV-2 en fase de crecimiento exponencial en M9R a 37°C fue privado de aminoácidos durante 50 minutos al cabo de los cuales (minuto 0) fueron suministrados de nuevo, eliminándose la timina del medio (A) y añadiéndose NA (80 µg/ml) a los 0 minutos (B), a los 20 (C) y a los 40 (D). El momento de la adición de NA se indica mediante una flecha. El número inicial de part/ml fue de  $2.8 \times 10^7$ .



**Figura 42** EFECTO DE LA INHIBICION DE LA SINTESIS DE DNA SOBRE POBLACIONES DE OV-2 A 30°C CON SU PERIODO DE REPLICACION FINALIZADO

Un cultivo de OV-2 en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C fue privado de aminoácidos durante 60 minutos al cabo de los cuales (minuto 0) le fueron suministrados de nuevo, eliminandose la timina del medio (A) y añadiendose NA a los 0 minutos (B), 20 (C), 40 (D), 60 (E) y a los 80 (F). El momento de la adición de NA se indica mediante una flecha. El número inicial de part/ml fue de  $9.0 \times 10^6$ .



**Figura 43** EFECTO DE LA INHIBICION DE LA SINTESIS DE DNA SOBRE POBLACIONES DE OV-2 A 37°C CON SU PERIODO DE REPLICACION FINALIZADO

Un cultivo de OV-2 en fase de crecimiento exponencial en M9R a 37°C fue privado de aminoácidos durante 50 minutos, al cabo de los cuales (minuto 0) le fueron suministrados de nuevo (A), añadiéndose NA (80 µg/ml) a los 0 minutos (B), 20 (C), 40 (D) y 60 (E). El momento de la adición de NA se indica mediante una flecha. El número inicial fue de  $2.7 \times 10^7$  part/ml.

la síntesis de DNA ya que va incrementándose el número de divisiones residuales aunque siempre a un nivel muy bajo (inferior a un 50%).

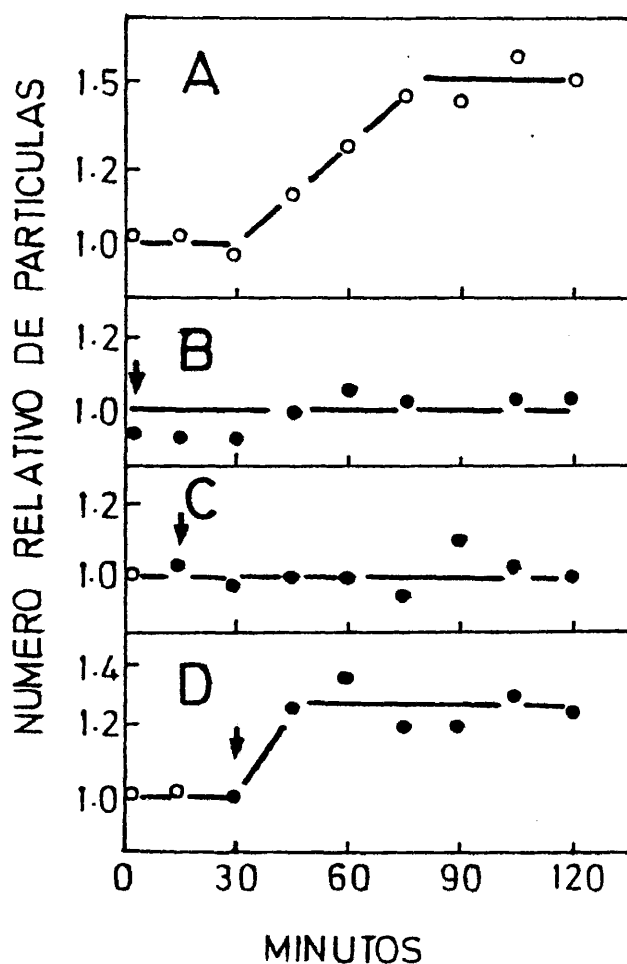
4.3.2 Necesidad de elongación cromosómica para que se reanude la división en células a las que se les ha inhibido la síntesis de proteínas.

Resultados anteriores muestran que la división en células con su período C finalizado queda inhibida por la acción del ácido malidíxico.

Para poder determinar si esta inhibición es debida al bloqueo de la síntesis de DNA o es un efecto secundario del inhibidor se estudió el efecto de la temperatura restrictiva sobre un mutante termosensible dna E. De esta manera se puede evitar el posible efecto secundario de los inhibidores sobre la división celular.

La estirpe portadora de una mutación dnaE estudiada fué E-486. Como todos los mutantes de este tipo la acción de la temperatura restrictiva (42°C) es la de inhibir la elongación del cromosoma por inactivación de la subunidad  $\alpha$  de la DNA polimerasa (46,86,70).

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la división celular en cultivos en los que había sido previamente inhibida la síntesis de proteínas durante un período lo suficientemente largo para que hubiesen finalizado las rondas de replicación en marcha. Durante un ayuno de timina, siguiente al tratamiento inhibitorio de la síntesis de proteínas, se producen un 50% de divisiones residuales (figura 44). La temperatura restrictiva inhibe completamente la división celular si la transferencia a 42°C ocurre inmediatamente a la desinhibición de la síntesis de proteínas. Si dicha transferencia se realiza en el momento en que se reanuda la división celular en condiciones de ausencia de timina se obtiene un 25% aproximadamente de divisiones residuales. Estos resultados indican la necesidad de replicación para que se dividan las células que han duplicado, teóricamente, su contenido genético duran-



**Figura 44** EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DIVISION EN POBLACIONES DE E-486 CON SU PERIODO DE REPLICACION FINALIZADO

Un cultivo de E-486 en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C fue privado de aminoácidos durante 90 minutos, al cabo de los cuales (minuto 0) se le volvieron a añadir, eliminándose simultáneamente la timina del medio (A) y transfiriéndose a 42°C (momento indicado por una flecha) en el minuto 0 (B), 15 (C) y 30 (D). El número inicial fue de  $7.5 \times 10^6$  part/ml.

te un período previo de inhibición de síntesis de proteínas.

4.3.3 La recuperación de la división celular, después de una inhibición de la síntesis de proteínas, se puede realizar en ausencia de iniciación de replicación

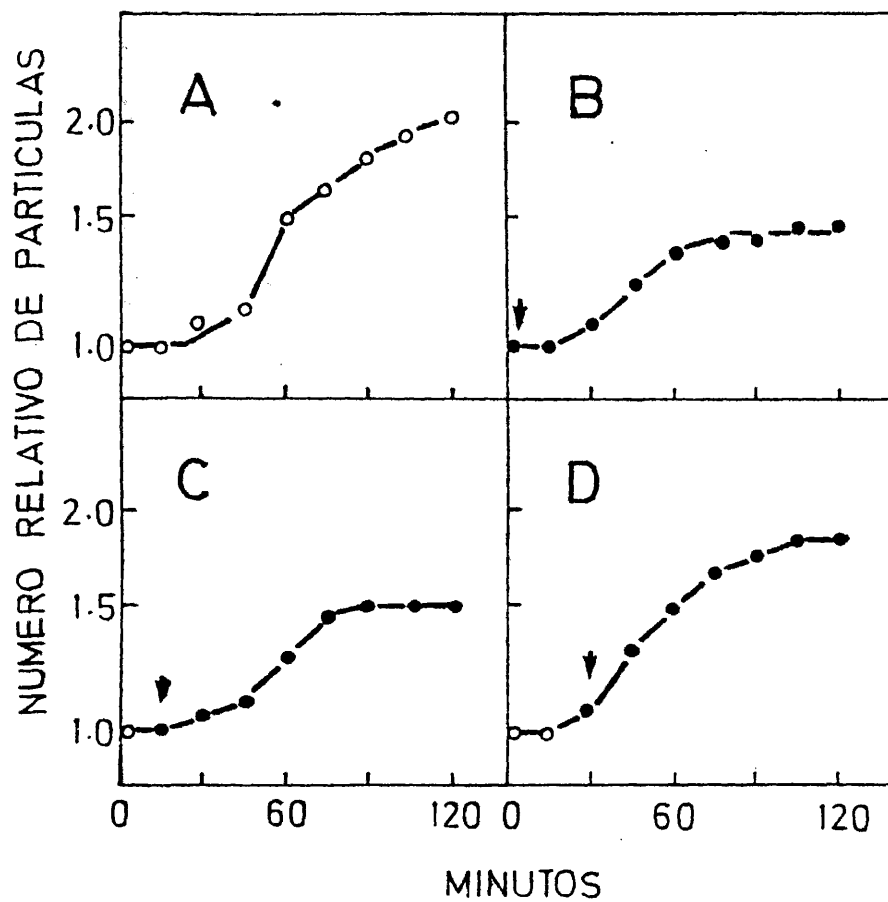
El planteamiento del problema es similar al del apartado anterior. La variación radica en el tipo de mutante utilizado. En este caso fué un mutante dna C: CT-284. El producto del gen dna C, que interacciona con la proteína Dna B (185), es necesario para la iniciación de la replicación del cromosoma, interviniendo también en la elongación del mismo (90,184). La estirpe CT-284 replica el DNA ya iniciado tanto a 30°C como a 42°C pero no puede iniciar nuevas rondas de replicación a la temperatura restrictiva (42°C). En la figura 45 se muestra el efecto de la temperatura restrictiva sobre la división celular en cultivos de la estirpe CT-284 a los que previamente se había inhibido la síntesis de proteínas durante un período de 90 minutos (durante este proceso inhibitorio finalizan las rondas de replicación que ya se habían iniciado). Como se puede observar la temperatura restrictiva no inhibe totalmente la división sino que permite hasta un 50% de divisiones desde el mismo momento en que se restaura la síntesis de proteínas.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos en los apartados 4.3.1 y 4.3.2 se pueden obtener las siguientes conclusiones: Si a un cultivo en fase de crecimiento exponencial se le inhibe la síntesis de proteínas durante un período lo suficientemente largo para que finalicen las rondas de replicación iniciadas y posteriormente, al ser desbloqueada la síntesis de proteínas, es inhibida la síntesis de DNA (por medio de ácido nalidixico) o la elongación del cromosoma (por medio de la temperatura restrictiva en una estirpe dna E) queda inhibida totalmente la división. Si se inhibe la iniciación de nuevas rondas de replicación (por medio de la temperatura restrictiva en una estirpe dna C) o se priva de timina a la población celular, se produce una divi-



sión residual. Estos resultados nos llevan a concluir que :

- 1.- después de una inhibición de síntesis de proteínas de una duración mayor que el período de replicación es necesaria una síntesis de DNA para que se reanude la división celular y
- 2.- que la inhibición de la síntesis de DNA por medio de un ayuno de timina (en estirpes que presenten esta auxotrofia) no es inmediata ni total.



**Figura 45** EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DIVISION EN POBLACIONES DE CT-284 CON SU PERIODO DE REPLICACION FINALIZADO

Un cultivo de CT-284 en fase de crecimiento exponencial en M9R a 30°C fue privado de aminoácidos durante 90 minutos al cabo de los cuales (minuto 0) se le volvieron a añadir, eliminándose simultáneamente la timina del medio (A) y transfiriéndose a 42°C (momento indicado por una flecha) en el minuto 0 (B), 15 (C) y 30 (D). El número inicial fue de  $1.2 \times 10^7$  part/ml.

1/13

## DISCUSSION

### 5.1 HIPOTESIS DE TRABAJO. CRITERIOS OPERACIONALES EN EL ESTUDIO DE MUTANTES

La división celular en condiciones en que el material genético no se hubiese duplicado conduciría a la aparición de células sin información genética, las cuales no serían viables.

Una hipótesis lógica para explicar la relación entre replicación y división sería la siguiente: en el proceso evolutivo las bacterias han debido desarrollar algún mecanismo que impida la división hasta que no se haya duplicado su genoma.

En condiciones fisiológicas de crecimiento se observa que la división celular ocurre siempre después de un período de tiempo a partir del término de la replicación. Este hecho podría ser debido a una relación unívoca replicación-división o bien a una simple casualidad temporal. La replicación podría ocurrir durante la vida celular, finalizando antes de la división, gracias a la existencia de algun/os otro/s proceso/s cuyo desarrollo fuese la etapa limitante de la división. Procesos de este tipo podrían ser por ejemplo la adquisición de una determinada masa, longitud, densidad, presión interna, etc.

Nuestra hipótesis de trabajo, que es la anteriormente dicha, no excluye la posibilidad de que ocurran mecanismos reguladores de la división de otro tipo. Nos parece coherente pensar que las células hayan desarrollado un mecanismo preciso ante un tema de tan vital importancia para su supervivencia y competencia interespecífica como esta relación entre la replicación y la división.

Para el estudio de este problema se pensó en la utilización de mutantes termosensibles de división. El empleo de mutantes en el estudio de la división bacteriana ha sido y es muy amplio: ver Helmstetter *et al* (62). Sin embargo, pocos mutantes han ayudado a resolver las preguntas surgidas de los estudios bioquímicos y fisiológicos en las estirpes salvajes. Slater y Schaechter

(159) apunta tres criterios operacionales que deben ser cumplidos para que las conclusiones obtenidas del estudio de los mutantes sean significativas:

- 1.- Determinar si un fenotipo complejo es debido a un efecto pleiotrópico de una sola mutación o al efecto de diversas mutaciones.
- 2.- Determinar si dos mutaciones con el mismo fenotipo aparente tienen una lesión en el mismo cistrón.
- 3.- Determinar si la mutación es específica de división.

Nuestros resultados cumplen como se irá comentando más adelante, estos tres requisitos.

## 5.2. EL GEN FTSA Y EL CICLO DE DIVISION CELULAR DE ESCHERICHIA COLI

MAC-1 y MAC-2, mutantes termosensibles de división, descritos respectivamente por de Pedro *et al* (31,32) y por Llamas (108) fueron obtenidos por mutagénesis con nitrosoguanidina de la estirpe MC6 (Escherichia coli K-12). Este agente mutágeno presenta efectos drásticos produciendo múltiples mutaciones que se encontrarán muy cercanas, ya que actúa preferentemente sobre la horquilla de replicación (19). Resultados sin publicar de de Pedro, M.A. y de Tormo, A. pusieron de relieve la existencia de mutaciones secundarias en la estirpe MAC-1 y su derivado MAC-3 (30,176). Por otra parte Fenoll (44) y Tormo, A. (resultados sin publicar) observaron que el clorarfénicol induce lisis celular en mutantes termosensibles derivados de la estirpe MC6 pero no en aquellos derivados de OV-2, quizás debido a las diferencias existentes en las envolturas celulares entre las estirpes (154,179). Estas observaciones fueron las que nos indujeron a transducir las mutaciones termosensibles de división presentes en las estirpes MAC-2 y MAC-3 a la estirpe OV-2. Se intentaba por una parte eliminar las mutaciones secundarias y por otra que el fondo genético de las estirpes fuese el adecuado para estudios fisiológicos.

Los análisis de complementación realizados con las estirpes en estudio (ver Tabla VI) indicaron que las mutaciones denominadas inicialmente divA, presente en MAC-1 y en su derivado MAC-3 (30,32), y divB, presente en MAC-2 (108) son formas alélicas del gen ftsA. Dado que esta denominación es anterior (67) se llamó a dichas mutaciones ftsA-3 y ftsA-2 respectivamente. De los resultados de la complementación se deduce también que dichos alelos son recesivos respecto a la forma salvaje ya que en condición de zigosis para dicho gen, el fenotipo resultante es termorresistente.

El comportamiento fenotípico de las estirpes D-2 y D-3 les caracteriza como mutantes termosensibles de división. A la temperatura permisiva no se manifiesta ninguna anomalía, compor-

tandose como la cepa parental OV-2. Sin embargo a 42°C la división celular queda detenida inmediatamente sin que aparentemente se vea afectada la biosíntesis de macromoléculas, descartándose así que la inhibición de la división sea una consecuencia indirecta de alteraciones en la síntesis de proteínas o en la síntesis de DNA (figuras 3 y 5). La presencia de nucleoides distribuidos uniformemente a lo largo de los filamentos (figura 6) nos indica, además de que la síntesis de DNA se produce normalmente, que la segregación de los cromosomas no se encuentra afectada a 42°C. La morfología de los filamentos es característica de todos los mutantes ftsA (180) presentando unas ligeras constricciones en aquellos lugares en los que presumiblemente se debían haber formado los septos (figura 4). Dicha morfología junto con la inhibición inmediata de la división nos lleva a la idea de que el proceso afectado comienza en una fase muy temprana de la septación y finaliza en el mismo momento de la separación de las células hermanas. Este comportamiento, si bien no es exclusivo de los mutantes ftsA (62), se diferencia de otros mutantes de división en los que el proceso afectado está localizado durante una fase temprana del ciclo como pueden ser los mutantes ts52 (201) que presentan una división residual muy alta (70%) al ser transferidos a la temperatura restrictiva, indicando que la mayor parte de la población es insensible a la temperatura restrictiva, posiblemente debido a que los procesos termosensibles han sido realizados a la temperatura permisiva.

D-2 y D-3 presentan una diferencia importante: El producto del gen ftsA-3 una vez ha sido inactivado por efecto de la temperatura no vuelve a ser activo, teniendo que sintetizarse de nuevo para que se desbloquee la división (figura 10). Por el contrario, el producto del gen ftsA-2, al retornar el cultivo a la temperatura permisiva, recobra su actividad no teniendo que volver a sintetizarse de nuevo para que se recupere la división (figura 10). Otra diferencia observada es el tiempo que tarda en producirse la división tras el retorno a condiciones permisivas. En el caso

de D-2 es de 10 a 15 minutos mientras que en D-3 es de 24 minutos (figura 10). Esta diferencia puede ser atribuible a que D-3 debe sintetizar de nuevo la proteína FtsA mientras que D-2 no. Puede reflejar también diferencias entre ambas proteínas a 30°C. Es posible que el producto del gen ftsA-3 sea menos activo a la temperatura permisiva que la proteína FtsA-2. La existencia de dichas diferencias puede ser una herramienta muy útil en la caracterización de la proteína FtsA. Los resultados obtenidos para ambas es- tirpes no deberán presentar contradicciones siempre que se tengan en cuenta dichas diferencias. Al ser los resultados coherentes entre sí se podrán descartar que los efectos observados sean debidos a la presencia de posibles mutaciones secundarias. Además, cierta información imposible de obtener en un tipo de mutantes nos podrá venir dada por el otro tipo, complementándose así los resultados. Por otra parte, los resultados obtenidos por OV-16 (38) pueden dar un enfoque complementario. Este mutante está afectado en la síntesis de la proteína FtsA a 42°C, debido a la presencia de una mutación ambar en el gen ftsA, pudiendo sintetizar dicha proteína a 30°C, debido a la presencia de un supresor ambar termosensible.

El tiempo que tarda en recuperarse la división después de la inactivación de la proteína FtsA es constante e independiente tanto de la velocidad de crecimiento como del tiempo que duró la inactivación (figuras 12,17). Además, en estas condiciones, se produce una oleada de divisiones bastante sincrónicas cuya magnitud depende del período de inactivación o de la velocidad de crecimiento (figuras 16 y 19). Los resultados obtenidos son explicables si al ser inactivada la proteína FtsA no solo se detiene la división sino que se produce una regresión del proceso a una fase anterior del ciclo de división. En el caso de D-3 para que las células puedan dividirse, tras el retorno a las condiciones permisivas, será necesario que se realice un ciclo completo de síntesis y acción de la proteína FtsA, mientras que en el caso de D-2 será necesaria solamente la acción. El hecho de que la división sincró-



nica observada en D-2 llegue a ser superior a un 100% indica que la proteína FtsA-2 puede sintetizarse en condiciones restrictivas permaneciendo inactiva hasta su vuelta a 30°C. En el caso de D-3, aunque se sintetice la proteína FtsA-3 en condiciones restrictivas, al volver a 30°C deberá volver a sintetizarse de nuevo. Al no aumentar la magnitud de la división sincrónica nos indica que se sintetiza la proteína FtsA en una cantidad que permite la formación de un solo septo y por tanto que el número de copias de la proteína que se sintetiza, no depende ni de la masa celular ni de el contenido de equivalentes genómicos de la célula. El hecho de que solo se forme un septo por célula apoya los resultados de Teather *et al* (171) que les lleva a postular la existencia de un factor que a una concentración determinada se consume totalmente en la formación de un septo, aunque haya más lugares posibles.

Los resultados obtenidos en cultivos sincrónicos de la estirpe D-3 nos permitió localizar el período de acción de la proteína FtsA-3 en relación con el ciclo de división. Dichos resultados (figura 18) indican que la síntesis y acción de la proteína FtsA-3 tienen lugar durante los últimos 25 minutos del ciclo de división, durante el período D y posiblemente presentando un solapamiento con el término de la ronda de replicación del cromosoma. Otra alternativa a éste y otros experimentos sería que la proteína FtsA se sintetizara durante una fase más o menos temprana del ciclo pero que dicha proteína tuviese una caracter inestable quedando inactiva más o menos rápidamente al no poder ser utilizada por la célula. Este posible caracter de inestabilidad queda rebatido por nuestros resultados ya que la proteína FtsA sintetizada a 42°C vuelve a ser activa, en el caso de D-2, tras su retorno a 30°C, incluso cuando la incubación ha sido de 60 minutos (figura 19). Además, Donachie *et al* (38) demostraron que la síntesis de proteína FtsA ocurre durante las etapas finales del ciclo de división.

Un aspecto interesante es el estudio de la septación en los filamentos de las estirpes mutantes tras su retorno a condicio-

nes permisivas. La primera división podría ocurrir por formación de un septo en un lugar determinado de la célula que podría ser el lugar de septación más antiguo o aquellos más recientes. Otra posibilidad sería que la septación se realizara a partir de los esbozos presentes (observables por las constricciones existentes en los filamentos) pero no de una manera orientada, sino al azar. Finalmente otra posibilidad sería que los septos esbozados hubiesen quedado inutilizables produciéndose la septación en otros lugares del filamento de una manera constante o bien al azar. Los resultados (figuras 13,14,15 y resultados no expuestos), a falta de un estudio estadístico, muestran que los lugares de septación formados a 42°C siguen siendo funcionales tras el retorno a 30°C. También muestran estos resultados que la septación se realiza a través de estos lugares de una manera al azar y no orientada ya que la división ocurre bien a partir de los extremos, bien a partir de la zona central o bien a partir de una zona media. Estos resultados apoyan la hipótesis de Teather et al (171) que considera que la probabilidad de formar septo en una célula con varios lugares posibles de septación es igual en todas ellas.

Un resultado muy importante que nos llevó a estudiar las posibles relaciones entre la proteína FtsA y las proteínas de terminación fue la necesidad de un pulso de síntesis de DNA para que la proteína FtsA-3 se sintetizase o/y actuase. El experimento (figura 21) se realizó con dos inhibidores de la síntesis de DNA (ácido nalidíxico e hidroxíurea), obteniéndose idénticos resultados en ambos casos. Al ser los dos antibióticos diferentes, tanto en estructura como en modo de actuación, quedaba descartada la posibilidad de que los resultados observados fuesen un artefacto del método. No se realizó la inhibición mediante privación de timina ya que este sistema permite una cierta replicación residual. Además, los inhibidores de síntesis de DNA bloqueaban la división de D-3 si se añadían en el momento del retorno a la temperatura permisiva pero la permitían si se suministraban después de un período corto de tiempo (5 minutos). También permitían la división de D-2 si la adición se realizaba en el momento mismo de la trans-

ferencia a condiciones permisivas. No parece, por tanto, posible que la inhibición de la división sea debido a un efecto secundario de los antibióticos utilizados.

Dos posibilidades podrían dar cuenta de estos resultados. Una de ellas sería que la actuación de la proteína FtsA requiriera replicación y otra que su síntesis fuese inducida, de alguna manera, por la replicación del DNA. La primera de las opciones quedaba descartada ya que la proteína FtsA-2 podía actuar posibilitando la división en ausencia de síntesis de DNA (figura 22). De estos resultados, que se confirmaron en otro tipo de experimentos que se comentarán mas adelante, pudimos concluir que la proteína FtsA es inducida por la replicación de DNA. La necesidad de síntesis de DNA para la inducción de síntesis de proteínas ya ha sido descrita en algunas ocasiones. Así Gudas *et al.*, (52) observaron que la proteína D no se sintetiza en presencia de ácido nalidixico y Hanawalt y Wax (55) mostraron la necesidad de replicación del DNA para la transcripción de ciertas enzimas reprimidas como la  $\beta$ -galactosidasa. El posible significado de esta inducción de la proteína FtsA se comentará más adelante.

De todos los resultados comentados hasta ahora, podemos concluir que el producto del gen ftsA codifica una proteína cuya síntesis es inducida por replicación de DNA y cuya acción, necesaria para que las células se dividan, se realiza durante las etapas finales del ciclo de división, desde el término de la replicación hasta la separación física de las células, siendo dicho período constante e independiente de la velocidad de crecimiento. Además, la síntesis y la acción de la proteína FtsA pueden ser desfasadas en el tiempo ocurriendo la formación de septo de una manera al azar a través de cualquier lugar potencial de septación.

### 5.3 SIMITUD ENTRE LAS PROTEINAS FTSA Y DE TERMINACION

Jones y Donachie (80) postularon la existencia de una o varias proteínas a las que denominaron genéricamente proteína de terminación. El significado del control realizado por esta proteína sería el de permitir la división celular solo cuando hubiese finalizado la replicación del cromosoma. Las características de dicha proteína, postuladas en base a los resultados obtenidos en experimentos de alineamiento cromosómico, son los siguientes:

- 1.- La proteína de terminación es necesaria para la división.
- 2.- El término de la replicación del cromosoma induce la síntesis de la proteína de terminación.
- 3.- La acción de la proteína de terminación se realiza sobre los primordios de septos conduciendo a la célula a la división.
- 4.- Su síntesis y acción pueden tener lugar durante un corto período de tiempo, de aproximadamente cinco minutos.
- 5.- Según Hoffmann *et al* (69) la adquisición de sensibilidad a la penicilina requiere el término de las rondas de replicación junto con un período de síntesis de proteínas. Jones y Donachie (80) sugieren que la sensibilidad a la penicilina se encuentra relacionada con el control ejercido por la proteína de terminación.

Los resultados obtenidos por nosotros sugerían la posibilidad de que la proteína FtsA fuese una proteína de terminación:

- 1.- La proteína FtsA, al igual que la proteína de terminación, interviene específicamente en la división celular (figura 3).
- 2.- La proteína FtsA requiere para su síntesis una replicación simultánea de DNA (figuras 21 y 22). El hecho de que se sintetice durante las últimas fases del ciclo de división sugiere que la replicación que induce dicha síntesis sea la del término del cromosoma. Para aclarar este punto se realizó un alineamiento cromosómico observándose que la división celular se retrasaba si la inactivación de la proteína FtsA se realizaba en fases cercanas

al término de la replicación (figura 30), apoyando este hecho la posibilidad de que la replicación de un segmento de DNA cercano al término del cromosoma sea el que induzca la síntesis de DNA. Otro tipo de resultados, que se comentaran más adelante, apoyan esta idea.

3.- La acción de la proteína FtsA es posible que se realice sobre primordios de septos. Durante una incubación a la temperatura restrictiva se producen filamentos en los que se observan unas ligeras constricciones localizadas en los lugares en que presumiblemente debían haberse desarrollado los septos (figura 4). La inactivación de la proteína FtsA impide el desarrollo de dichos septos. Otras proteínas necesarias para la división que son codificadas por genes cercanos a ftsA intervienen en el desarrollo de los septos; uno de ellos es ftsQ (11) aunque se desconoce el modo en que interviene en la septación. El producto del gen ftsZ (45,68, 106,180) interviene en la iniciación de la septación mientras que el del gen envA (107,126,127,128,192) actúa durante el final de la septación.

4.- La síntesis y acción de la proteína de terminación pueden tener lugar en un corto período de tiempo. Sin embargo la proteína FtsA-3 requiere para su síntesis y acción un lapso de tiempo de aproximadamente 25 minutos mientras que la acción de la proteína FtsA-2 requiere unos 12 minutos. Al no tener estas proteínas una estructura primaria idéntica a la de la proteína FtsA de una estirpe no mutante, es posible que la conformación de la proteína FtsA en las estirpes D-2 y D-3 esté afectada a 30°C, ocasionando una pérdida de actividad a la temperatura permisiva que se trasluciría en un alargamiento de su período de acción. Si éste fuese el caso el período de síntesis y acción de la proteína de terminación debería alargarse en las estirpes mutantes a la temperatura permisiva. En efecto, (figuras 36 y 37) dicho período presentaba un desfase respecto a OV-2 (cepa parental) de 20 minutos en el caso de D-3 y de 5 minutos en el caso de D-2. Podemos, por tanto, concluir que el período de síntesis y acción de la proteína de terminación es de 5 minutos en OV-2, de 25 minutos en D-3 y de

10 minutos en D-2 coincidiendo dichos periodos con los requeridos por las proteínas FtsA-3 y FtsA-2 a 30°C para que se recupere la división después de su inactivación. Esta conclusión también se obtuvo de los resultados de un experimento de aineamiento inverso (figuras 32 y 33). El periodo de síntesis y acción de la proteína de terminación a 30°C presentaba un alargamiento de 25 minutos respecto a OV-2 en poblaciones celulares con todos los requisitos necesarios para la división cumplidos excepto la síntesis y acción de la proteína de terminación. Al ser los dos tratamientos distintos y los resultados obtenidos idénticos puede descartarse que los resultados obtenidos sean un artefacto del tratamiento.

5.- La posibilidad de que la proteína de terminación esté relacionada, según Jones y Donachie (80), con la adquisición de sensibilidad a la penicilina que según Hoffmann *et al* (69) ocurre al término de las rondas de replicación requiriendo un periodo de síntesis de proteínas se cumple para la proteína FtsA. La sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos ensayados es idéntica a la temperatura permisiva para las tres estirpes estudiadas, OV-2, D-2 y D-3 (figuras 23,24,25). Si la proteína FtsA estuviese relacionada con la adquisición de sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que inhiben la división (bencil-penicilina, ampicilina y cefalexina) sería de esperar que a la temperatura restrictiva (condiciones en las que las proteínas FtsA-2 y FtsA-3 son inactivas) las estirpes mutantes fuesen mucho más resistentes que la estirpe parental. En efecto, así sucede, siendo, por ej., la resistencia a bencil-penicilina a 42°C cinco veces superior en D-2 y D-3 (figuras 23,24 y 25). Estos resultados no parecen ser debidos a una peor entrada de los antibióticos en las células mutantes a la temperatura restrictiva o a la inducción de la enzima  $\beta$ -lactamasa a dicha temperatura ya que tanto las estirpes mutantes como la parental presentan, a las temperaturas permisiva y restrictiva, la misma sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos no relacionados con la septación (cefaloridina, mecillinam y ácido-6-amino-penicilánico). El hecho de que la inactivación de la proteína FtsA confiera una mayor resistencia a la penicilina se ve refor-

zada por la circunstancia de que OV-16 (estirpe con una mutación ambar en el gen *ftsA*) presenta, incluso a la temperatura permisiva, mayor resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos que inhiben la septación (C.Fernández-Cabrera y A.Tormo, resultados sin publicar). Esto puede ser debido a que la supresión a 30°C es solamente de un 13% (160), pudiendo esto ocasionar una disminución en el número de copias de la proteína FtsA por célula. Además el supresor termosensible inserta en el codón ambar tirosina o glutamina, entrando dentro de lo posible que la actividad de la proteína FtsA de OV-16 sufra una disminución en su actividad debido al cambio de un aminoácido (18).

Si la proteína FtsA fuese una proteína de terminación se podrían predecir dos hechos:

- 1.- La inactivación de la proteína FtsA inhibirá la división cuando ésta sea solo función, y se permita, de la síntesis y acción de la proteína de terminación. Nuestros resultados confirman esta predicción: el período de síntesis y acción de la proteína de terminación tiene, en los mutantes D-2 y D-3, un carácter termosensible (figuras 34 y 35).
- 2.- La síntesis de la proteína de terminación requiere ser inducida por una replicación simultánea de DNA. Nuestros resultados también confirman esta predicción. En efecto OV-2 (estirpe salvaje) necesita un pulso de síntesis de DNA para que se induzca la proteína de terminación (figura 38).

De los resultados comentados podemos concluir que la proteína FtsA se comporta como una proteína de terminación, siendo su actuación necesaria, hasta el término de la división.

Un aspecto de la fisiología de la proteína FtsA es su constancia en el período de síntesis y acción independientemente del tiempo de generación. En el caso de la estirpe D-3 es de aproximadamente 25 minutos. Este resultado podría llevarnos a concluir que dicha proteína sería un reloj celular de división. Es decir, los procesos en los que intervienen, tienen una duración constante

independientemente del tamaño celular, de la concentración génica o de cualquier otro parámetro que fuera función de la velocidad de crecimiento. Sin embargo, existe la posibilidad de que la proteína FtsA-3 esté afectada a la temperatura restrictiva en comparación con la proteína FtsA de una estirpe no mutante. Este hecho es reflejo de las diferencias existentes entre el tiempo de síntesis y acción de la proteína de terminación de D-3 y de OV-2. Mientras que en OV-2 dicho período es de escasos minutos, en D-3 es de 25 minutos. Posiblemente no sea entonces un reloj celular sino una proteína que dispare una señal para la división o bien que intervenga estructuralmente en la formación del septo.



#### 5.4 REPLICACION Y DIVISION. INDUCCION DE LA PROTEINA FTSA

El hecho de que la síntesis de la proteína FtsA requiera para su inducción una síntesis simultánea de DNA presentaba una contradicción con la observación de que durante un tratamiento de alineamiento cromosómico se producen divisiones residuales. En efecto, durante la fase de inhibición de la síntesis de proteínas finalizarían las rondas de replicación en marcha (94,109) y, al no haber aminoácidos en el medio de cultivo, no se sintetizaría la proteína FtsA. Posteriormente, al ser inhibida la replicación por ayuno de timina y restablecidos los aminoácidos al medio, se observa una oleada de divisiones. Esta no podría haber ocurrido sin la presencia y acción de la proteína FtsA. Tres posibilidades podrían dar cuenta de este hecho.

- 1.- La síntesis de la proteína FtsA no requiere para su inducción una síntesis simultánea de DNA. Los resultados obtenidos en este trabajo, excluyen esta posibilidad.
- 2.- La síntesis de la proteína FtsA necesita para su inducción una síntesis de DNA, produciéndose la traducción en una etapa muy temprana del ciclo celular y ejerciendo su acción durante las etapas finales del ciclo de división. Si este fuera el caso todas o casi todas las células del cultivo habrían sintetizado la proteína FtsA cuando dió comienzo la inhibición de la síntesis de proteínas. Durante el período inhibitorio de la replicación se sintetizarían todas las proteínas necesarias para la división excepto la FtsA que ya estaría sintetizada. Esta posibilidad también se puede excluir en base a los resultados obtenidos por Donachie et al (38). Los resultados obtenidos por estos autores del estudio de una mutación ámbar del gen ftsA (estirpe OV-16) muestran que la proteína FtsA se sintetiza durante las etapas finales del ciclo de replicación y no durante una fase temprana del ciclo. Por tanto, la proteína FtsA no se habría sintetizado, en la mayor parte de la población, cuando dió comienzo la inhibición de la síntesis de proteínas.
- 3.- La proteína FtsA es inducida por una síntesis de DNA. En este caso, y eliminadas las dos posibilidades anteriores, la proteína

FtsA se habría sintetizado durante el período de ayuno de timina. Por tanto, durante este período tendría que haberse producido síntesis de DNA.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el contenido intracelular de timina o de los nucleótidos de dicha base en la estirpe OV-2 podrían dar cuenta de una cierta replicación residual (figura 9). Por otra parte, Marunouchi y Messer (116) habían propuesto que durante una inhibición de la síntesis de proteínas las rondas de replicación no finalizan quedando un 0.5% del cromosoma sin replicar. El contenido intracelular de precursores de DNA (6,123) podría permitir la replicación de este segmento. Por tanto, la presencia de síntesis de DNA durante el ayuno de timina podría inducir la síntesis de la proteína FtsA. Sin embargo, siguiendo el mismo protocolo de Marunouchi y Messer (116), Loehr y Hanowalt (99) sugieren la posibilidad de que los resultados de los anteriores autores fueran un artefacto, aunque no excluyen la posibilidad de que no lo sean. De todas maneras, el hecho de que exista un cierto contenido intracelular de precursores de DNA permitiría, al menos, una replicación residual que sería suficiente para la inducción de la proteína FtsA.

Para comprobar la existencia o no de replicación durante el período de ayuno de timina se realizaron diversos experimentos con OV-2 (cepa parental), con CT-284 (estirpe con una mutación termosensible en el gen dnaC) y con E-486 (estirpe con una mutación termosensible en el gen dnaE). Los resultados obtenidos (figuras 41,42,43,44,45) vuelven a sugerir que la inhibición de la replicación por medio de ácido nalidíxico es inmediata mientras que no lo es si se realiza por privación de timina. Por otra parte, el hecho de que el bloqueo de la elongación cromosómica inhiba, en las condiciones descritas, la división nos indica que en dichas condiciones se produce una replicación que es necesaria para que ocurra división celular, que dicha replicación es inhibida por ácido nalidíxico y no por privación de timina. Finalmente, el que la inhibición de la iniciación no afecte a la división

es, aparentemente, un indicio de que durante una inhibición de la síntesis proteica las rondas de replicación avanzan pero quedan detenidas cerca del término. Es decir, nuestros resultados apoyarían a los de Marunouchi y Messer (116). Existe otra explicación alternativa. OV-2, en las condiciones utilizadas para su crecimiento, presenta varias rondas de replicación en marcha (figura 29). Durante el período de inhibición de la síntesis de proteínas podrían finalizar las rondas más avanzadas mientras que aquellas más retrasadas podrían quedar detenidas relativamente cerca del término, bien por no haber sido suficiente el tiempo de inhibición, bien porque hubiese algún tipo de impedimento estérico al no haber podido segregarse los cromosomas hermanos. Esta posibilidad no deja de ser una hipótesis ya que los conocimientos actuales sobre la terminación de la replicación son casi nulos. De todas maneras se han descrito impedimentos estéricos durante la replicación. Así Helmstetter y Pierucci (61) observaron que la mínima distancia posible entre dos horquillas de replicación es de aproximadamente 20 minutos de cromosoma. Si la posibilidad anteriormente apuntada fuese correcta, nuestros resultados no estarían en contradicción con los de Loehr y Hanawalt (99). Recientemente Marsh y Hepburn (113) mediante incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en los fragmentos de restricción de EcoRI concluyeron que un ayuno de aminoácidos no detiene a las rondas de replicación en marcha justo antes del término. También concluyeron que durante el período de ayuno de timina se produce iniciación de nuevas rondas y una replicación residual. En los experimentos realizados por estos autores el medio de cultivo era bastante pobre mientras que la concentración de timina era alta (40  $\mu\text{g/ml}$ ). En estas condiciones el tiempo de generación es largo mientras que el período de replicación no debe variar significativamente respecto a medios más ricos en nutrientes. Es, por tanto, posible que en estas condiciones solo haya una ronda de replicación en marcha que finalizaría durante el período de inhibición proteica. La replicación residual de la fase posterior sería lógicamente de la región de oriC, mientras que en nuestro caso, si la hipótesis fuese correcta, la replica-

cción también se realizaría a partir de los complejos de replicación detenidos por un efecto posiblemente estérico.

En resumen, de los resultados de este trabajo y de otros autores, se puede concluir que la proteína FtsA necesita para su inducción una síntesis simultánea de DNA. Tras un ayuno de aminoácidos ambas síntesis ocurrirán en presencia o ausencia de timina, permitiéndose, por tanto, la división celular.

Un aspecto de la relación entre la síntesis de DNA y la síntesis de la proteína FtsA cuyo conocimiento sería interesante es qué segmento de DNA es necesario que se replique para que se induzca la síntesis de la proteína FtsA. Los resultados tanto de este trabajo como los de la literatura no permiten hacer conclusiones aunque sí suposiciones. El segmento cuya replicación es necesaria para la inducción de la síntesis de la proteína FtsA podría ser inespecífico o bien un segmento inicial, terminal o medio. Si el segmento fuese inespecífico la proteína FtsA estaría sintetizándose de una manera constitutiva ya que su síntesis estaría continuamente inducida. Por otra parte, de nuestros resultados sabemos que el segmento de DNA que se replica debido al contenido intracelular de precursores de DNA después de una inhibición prolongada de síntesis de proteínas no es un segmento medio del cromosoma. Por tanto el segmento que se debe replicar para que se induzca la proteína FtsA debe ser o terminal o inicial. Cánovas et al (17) concluyeron del estudio de estirpes Hfr con una mutación termosensible en el gen dnaA que el término de la ronda de replicación del cromosoma no es per se un requisito absoluto para el proceso de división y que la única condición para que se sintetice la proteína de terminación es la duplicación de uno o mas genes situados, en las estirpes salvajes, en el extremo final del cromosoma. Esta conclusión apoya la hipótesis de que el segmento que debe replicarse para la inducción de la proteína FtsA es un segmento terminal. Los resultados comentados en el apartado 4.2.7 de este trabajo también parecen apoyar aunque indirectamente, esta hipótesis. Si a una población de D-3 con su replicación finalizada

(o casi finalizada) por inhibición de síntesis de proteínas, se la priva de timina y simultaneamente se transfiere a la temperatura restrictiva, la proteína FtsA se inactiva, tras sintetizarse. Si a continuación añadimos timina al medio y retornamos el cultivo a 30°C se reanuda la síntesis de DNA produciéndose la división 50 minutos después, es decir, cuando el cromosoma está cercano al término de su replicación. Por otra parte se vió que la acción de la proteína FtsA ocurre al término de la ronda de replicación. Si la acción es inmediata a su síntesis como se deduce de los resultados de Donachie et al (38) y de este trabajo, la síntesis de la proteína FtsA deberá ocurrir en una fase tardía de la replicación. Por tanto, la replicación del segmento terminal del cromosoma debe ser el que induzca la síntesis de la proteína FtsA.

#### 55.5 INTEGRACION DE NUESTROS RESULTADOS EN EL CONTEXTO DE LAS TEORIAS SOBRE LA REPLICACION Y LA DIVISION

Durante un crecimiento balanceado, la replicación del cromosoma y la división celular se encuentran coordinados de tal manera que una inhibición de la síntesis de DNA (por medio de ausencia de precursores, de inhibidores químicos o físicos o de alteraciones en el DNA) ocasiona una inhibición de la división (21, 22, 36, 37, 58, 60, 78, 80, 181). Clark (21) observó los siguientes hechos: La división celular es independiente de la iniciación de la replicación, la división se inhibe si se inhibe la síntesis de DNA antes de que termine la replicación, los últimos estadios del ciclo de división pueden ocurrir en ausencia de síntesis de DNA y, finalmente, la división, en condiciones fisiológicas, ocurre entre el término de una ronda de replicación y la separación de las células hermanas. Se ha postulado que la replicación del segmento terminal del cromosoma es un requisito necesario para que se produzca la división, actuando como coordinador entre ambos ciclos (60, 69, 80, 116, 134, 138, 202). Woldringh et al (190) y Sargent (149, 150) proponen que el bloqueo de la división, debido a una inhibición de la replicación, es debido a que los cromosomas al no poder segregarse, ya que no ha finalizado la replicación, bloquean el lugar donde debería haberse formado el septo. Esto viene apoyado por el modo de formación de células anucleadas a partir de filamentos con la replicación detenida (65, 66, 74, 169). En estos casos la división ocurre por los extremos del filamento y no por su zona central donde se encuentra el nucleóide. Esto sugiere que la no segregación impide la formación del septo. Sin embargo, el hecho de que los filamentos formados por ausencia de replicación (incubación en presencia de inhibidores, en ausencia de precursores o en condiciones restrictivas, los mutantes dna) no produzcan, como norma general, células sin DNA parece invalidar la anterior hipótesis. En estas condiciones las células crecen en longitud, filamentando, y produciendo nuevos lugares de septación, libres de nucleóides. Helmstetter et al (62) sugieren que la división podría continuar indefinidamente

en ausencia de replicación si la inhibición de ésta no afectara estructuralmente al cromosoma y/o las funciones de transcripción y traducción. Es fácil la comprobación de lesiones pero es imposible la comprobación de que no existen lesiones. Aparentemente las células auxótrofas para la timina, en condiciones de ausencia de ésta, aumentan normalmente en masa, recuperándose bien la división al restituir al cultivo el precursor mencionado.

Otro postulado es el que propone alguna señal acopladora entre replicación y división bien a lo largo de la síntesis de DNA, bien al término de ésta (21,69,80,116,138,201). Diversos autores han propuesto distintas teorías acerca de la posible coordinación entre el término de la replicación y la división a través de señales específicas y acopladoras como un aumento en [dTTP] intracelular que ocurre al término de C (73). Lutkenhaus *et al* (105) analizaron 750 proteínas a lo largo del ciclo para determinar si se producía una síntesis discontinua en algún momento determinado del ciclo. Observaron que las proteínas analizadas se sintetizaban continuamente, hecho que les llevó a postular que el control del ciclo se realiza por medio de variaciones, no en la cantidad sino en la actividad de las enzimas. Sin embargo no todas las proteínas se sintetizan continuamente. Pierucci (133) observó incrementos en la síntesis de ciertos compuestos de la envoltura celular en el momento de la iniciación. Hofmann *et al* (69) observaron que la síntesis de peptidoglicano se incrementa en los últimos estadios del ciclo de división. Helmstetter y Pierucci (60) y Clark (22) propusieron que al término de una ronda de replicación se produce una señal para la división celular. Es lógico pensar que exista alguna proteína o factor que se sintetice, o active, al término de la replicación. Este sería el caso de la proteína ftsA que actúa durante las etapas finales del ciclo. Otro tipo de señal acopladora entre los ciclos de replicación y de división es el propuesto por Jones y Donachie (80). Esta señal acopladora sería la proteína de terminación que se sintetizaría al término de la replicación y actuaría de una manera esencial en los

procesos de división, bien como señal reguladora, bien como componente estructural del septo. Nuestros resultados nos llevan a postular que el gen ftsA codifica una proteína similar a la de terminación. Entraría dentro de lo posible que ciertos genes del agrupamiento que existe alrededor del minuto 2 del mapa cromosómico de Escherichia coli codificaron también para otras proteínas de terminación. Candidatas posibles, dado sus fenotipos de división, serían los genes ftsQ y ftsZ (11,45,68,106,180).

Una de las características observadas de la proteína FtsA es que su síntesis es inducida por la replicación del cromosoma. En ausencia de síntesis de DNA no se produce la proteína FtsA y por tanto queda inhibida la división. Sin embargo, se han descrito mutaciones en genes dna que en condiciones restrictivas pueden permitir la división de las estirpes que las albergan. Este tipo de mutantes se han descrito en E.coli (65,66,74,169), en B.subtilis (149,150) y en S.typhimurium (157,167). Esta división, en ausencia de síntesis de DNA produce células anucleadas. Son mutantes dna principalmente de iniciación del cromosoma bacteriano. Es importante hacer notar que este tipo de mutantes es algo excepcional, siendo la norma que los mutantes dna, en condiciones restrictivas, no se dividan. Además estas mutaciones no son específicas de un gen: otros alelos del mismo gen dna no se dividen en condiciones restrictivas. Inouye (74,75) propuso que el producto de ciertos genes dna además de intervenir en la replicación actúan como efectores negativos de la septación. Al término de la replicación se produciría un factor que desbloquearía la división celular. Aquellas mutaciones que afectasen, en condiciones restrictivas, a ambos efectos pleiotrópicos, resultarían en una división en ausencia de replicación, con la consiguiente formación de células anucleadas. Hirota et al (65), Hirota y Ricard (66) observaron que la formación de células anucleadas en mutantes dna requería primeramente la formación de filamentos con los extremos libres de DNA y posteriormente la expresión de una segunda mutación a la que denominaron div. Sin embargo, hay mutaciones dna que permiten la división en condiciones restrictivas sin que exista ninguna mutación secun-



daria conocida. Por otra parte, todos aquellos mutantes dna que se dividen en condiciones restrictivas, no lo hacen en presencia de inhibidores de síntesis de DNA. Además, no se ha observado en estirpes salvajes división alguna en ausencia de replicación (aparte de las divisiones de las células que hubieran finalizado su período de replicación). Por tanto, la división en ausencia de DNA requiere la expresión de ciertas mutaciones que alteran la relación entre síntesis de DNA y división. Todos estos resultados, muchos de ellos sin una explicación convincente, no permiten afirmar que, en condiciones normales, pueda producirse división en ausencia de síntesis de DNA. Sigue siendo una hipótesis válida el que la división quede inhibida si se detiene la replicación antes del término de las rondas.

Aparte de la relación existente entre la replicación y la división a través de las proteínas de terminación, de las que una de ellas es la proteína FtsA, se han descrito otros tipos de coordinación entre la síntesis de DNA y la división celular. Así, los genes rec A y lexA, que intervienen en los procesos de recombinación y reparación del DNA (75), influyen en la división. Cuando se producen alteraciones en el DNA por medio de agentes físicos o químicos la división se detiene. La proteína X, producto del gen recA (53,119) es un efector negativo de la septación (47,54, 72,151,188). En condiciones en que un bloqueo de la replicación conduce a una inhibición de la división, se ha observado una superproducción de la proteína X (54,77). Satta (151) observó una correlación positiva entre el daño realizado al DNA celular y la cantidad de proteína X sintetizada. Además, concluyó que ciertos mutantes dna solo se dividen a la temperatura restrictiva si la proteína X no es sintetizada. Los mutantes recA y lexA continúan dividiéndose cuando se inhibe la síntesis de DNA químicamente, por supresión de timina o por las condiciones restrictivas en mutantes dna (71,72,75). En caso de que la proteína X no se superproduzca, la división puede continuar en ausencia de síntesis de DNA formándose células anucleadas (51,151). Howe (71) postula que los mutantes lexA, en condiciones restrictivas, producen un

factor dominante difusible que decrece la síntesis o actividad de un inhibidor de la división cuando la síntesis de DNA se detiene por privación de timina. Es interesante el modelo propuesto por Little *et al* (98): La proteína LexA es un represor del cistron recA. En condiciones normales la actividad de dicha proteína ocasiona que los niveles de la proteína X sean muy bajos con lo que la actividad proteolítica del producto del gen recA sería insignificante. Si el DNA sufre algún daño se induciría de alguna manera la actividad proteolítica de la proteína X que degradaría al represor (proteína LexA) con la consiguiente expresión del gen recA y la posterior reparación del DNA; cuando desapareciera la presencia del inductor, aumentarían los niveles de la proteína LexA y se reprimiría el gen recA.

Los resultados expuestos y comentados en este trabajo apoyan el modelo de ciclo celular de Jones y Donachie (80) en detrimento del propuesto por Pritchard (140). En efecto, la proteína FtsA sería una señal acopladora entre la replicación y la división que ocurriría solamente si la replicación hubiese terminado y no, como considera Pritchard, ser debida exclusivamente a unos desequilibrios teóricos entre la velocidad de formación de la pared y el aumento en masa con ausencia de señales reguladoras. Al término de la replicación, e inducida por ella, se sintetiza la proteína FtsA que actúa durante las etapas finales del ciclo, interviniendo de una manera esencial en la división. En ausencia de replicación no se induciría la síntesis de la proteína FtsA y la división, en consecuencia, quedaría inhibida. La síntesis y acción de la proteína FtsA tiene un papel fundamental en la célula. Su ausencia impediría la división en células que no hubiesen duplicado su material genético que en caso de ocurrir llevaría a una inviabilidad de las células hijas resultantes.

Quedan aún muchos aspectos oscuros y contradictorios en la fisiología bacteriana en general y de la división en particular. Este trabajo ha pretendido aportar alguna luz a los conocimientos existentes de la división en Escherichia coli. Mucho

trabajo queda aun por hacer y muchos resultados quedan aun por explicar.

Quisiera terminar este trabajo con una cita de Martin Slater y Moselio Schaechter de 1974 (159) que sigue siendo aun vigente. "In the case of bacterial cell division the structural simplicity of bacteria is deceptive".

173

## CONCLUSIONES

- 1 Las mutaciones divA(Ts) y divB(Ts) son alélicas del gen ftsA. Al ser esta denominación más antigua, proponemos llamarlas ftsA-3 y ftsA-2 respectivamente.
- 2 Los alelos ftsA-3 y ftsA-2 tienen un carácter recesivo frente al alelo ftsA<sup>+</sup>.
- 3 El producto del gen ftsA es una proteína que proponemos denominarla proteína FtsA.
- 4 La proteína FtsA-3 es irreversible tras su inactivación térmica, mientras que la inactivación de la proteína FtsA-2 tiene un carácter reversible.
- 5 La proteína FtsA no interviene en los procesos de elongación, crecimiento en masa, síntesis de DNA o segregación cromosómica.
- 6 La proteína FtsA es necesaria para la división.
- 7 La iniciación de la septación puede realizarse en ausencia de actividad de la proteína FtsA.
- 8 La proteína FtsA actúa sobre los primordios de septos conduciendo a éstos a su terminación.
- 9 Los lugares de septación formados en ausencia de actividad de la proteína FtsA permanecen viables.
- 10 La probabilidad de formar septo en una célula con varios lugares de septación posibles es igual en todos ellos.
- 11 La proteína FtsA es estable, pudiendo ser desfasables en el tiempo su síntesis y su acción.

- 12 La síntesis y acción de la proteína FtsA se realiza durante la septación: desde el término de la replicación hasta la separación celular, teniendo dicho período una duración constante de 25 minutos y presentando un solapamiento con el término de la ronda de replicación.
- 13 La síntesis de la proteína FtsA necesita ser inducida por un pulso de síntesis de DNA, posiblemente por la replicación del segmento terminal del cromosoma.
- 14 El período de síntesis y acción de la proteína FtsA es constante e independiente del período de inactivación o de la velocidad de crecimiento. La proteína FtsA se comporta como un reloj celular.
- 15 El período de síntesis y acción de la proteína de terminación es 20 minutos mayor en D-3 y 5 minutos mayor en D-2 que en OV-2, coincidiendo la duración de dicho período con la síntesis y actuación de la proteína FtsA.
- 16 El período de síntesis y acción de la proteína de terminación es termosensible en los mutantes ftsA.
- 17 La síntesis de la proteína de terminación requiere ser inducida por un pulso de síntesis de DNA.
- 18 Las proteínas FtsA-2 y FtsA-3 no son totalmente activas en condiciones permisivas.
- 19 En ausencia de actividad de la proteína FtsA las células presentan una resistencia superior a la lisis frente a antibióticos que inhiben la septación.

- 20 La proteína FtsA se comporta como una proteína de terminación.
- 21 La privación de timina a la estirpe OV-2 y sus derivados no inhibe inmediata o totalmente la síntesis de DNA.
- 22 Para la recuperación de la división, después de una inhibición de la síntesis de proteínas de una duración superior al período de replicación, es necesaria la elongación del cromosoma pero no la iniciación de nuevas rondas de replicación.

BIBLIOGRAFIA



- 1 ABBO, E.E. and PARDEE, A.B. 1960. Synthesis of macromolecules in synchronously dividing bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 39: 478-483.
- 2 ADAMS, M.H. 1959. Methods of study of bacterial viruses. p: 443-522. *In* *Bacteriophages*. Interscience Publishers, Inc., New York.
- 3 ALLEN, J.S., FILIP, C.C., GUSTAFSON, R.A., ALLEN, R.G. and WALKER, J.R. 1974. Regulation of bacterial cell division: genetic and phenotypic analysis of temperature-sensitive, multinucleate, filament-forming mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 117: 978-986.
- 4 BACHMANN, B. and LOW, B. 1980. Linkage Map of *Escherichia coli* K-12, Edition 6. *Microbiol. Rev.* 44: 1-56.
- 5 BACHMANN, B., LOW, B. and TAYLOR, A.L. 1976. Recalibrated linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* 40: 116-167.
- 6 BEACHAM, I.R., BEACHAM, K., ZARITSKY, A. and PRITCHARD, R.H. 1971. Intracellular thymidine triphosphate concentrations in wild type and in thymine requiring mutants of *Escherichia coli* 15 and K-12. *J. Mol. Biol.* 60: 75-86.
- 7 BEGG, K.J. 1978. Cell surface growth in *Escherichia coli*: Distribution of Matrix Protein. *J. Bacteriol.* 135: 307-310.
- 8 BEGG, K.J. and DONACHIE, W.D. 1973. Topography of outer membrane growth in *E. coli*. *Nature New Biology* 245: 38-39.
- 9 BEGG, K.J. and DONACHIE, W.D. 1977. Growth of the *Escherichia coli* cell surface. *J. Bacteriol.* 129: 1524-1536.
- 10 BEGG, K.J. and DONACHIE, W.D. 1978. Changes in cell size and shape in thymine-requiring *Escherichia coli* associated with growth in low concentrations of thymine. *J. Bacteriol.* 133: 452-458.

- 11 BEGG, K.J., HATFULL, G.F. and DONACHIE, W.D. 1980 Identification of new genes in a cell envelope-cell division gene cluster of Escherichia coli: cell division gene ftsQ. J. Bacteriol. 144: 435-437.
- 12 BIRD, R. and LARK, K.G. 1968. Initiation and Termination of DNA replication after amino acid starvation of E. coli 15T<sup>-</sup>. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33: 799-808.
- 13 BIRD, R. LOUARN, J. MARTUSCELLI, J. and CARO, L. 1972. Origin and sequence of chromosome replication in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 70: 549-566.
- 14 BOYD, A. and HOLLAND, I.B. 1979. Regulation of the synthesis of surface protein in the cell cycle of Escherichia coli B/r. Cell 18: 287-296.
- 15 BURDETT, I.D.J. and MURRAY, R.G.E. 1974. Septum formation in Escherichia coli: characterization of septal structure and the effects of antibiotics on cell division. J. Bacteriol. 119: 303-324.
- 16 BURDETT, I.D.J. and MURRAY, R.G.E. 1974. Electron microscope study of septum formation in Escherichia coli strains B and B/r during synchronous growth. J. Bacteriol. 119: 1039-1056.
- 17 CANOVAS, J.L., TRESGUERRES, M.E.F., DE PEDRO, M.A. y LLAMAS, J.E. 1975. Control genético de la duración del ciclo de división celular en Escherichia coli. p: 61-82. En Portoles, A y Baquero, F. (ed). Aspectos actuales en la transmisión de información genética de microorganismos. Monografías básicas de la Sociedad Española de Microbiología. Madrid.
- 18 CELIS, J.E., HOOPER, M.L. and SMITH, J.D. 1973. Aminoacid acceptor stem of E. coli suppressor tRNA<sup>Tyr</sup> is a site of synthetase recognition. Nature New Biol. 244: 261-264.
- 19 CERDA-OLMEDO, E. and HANAWALT, P.C. 1968. The replication of

- the Escherichia coli chromosome studied by sequential nitro  
soguanidine mutagenesis. Cold Spring Harbor Symp. Quant.  
Biol. 33: 599-607.
- 20 CLARK, D.J. 1968. Regulation of deoxyribonucleic acid repli  
cation and cell division in Escherichia coli B/r. J. Bacte-  
riol. 96: 1214-1224.
  - 21 CLARK, D.J. 1968. Regulation of DNA replication and cell di  
vision in Escherichia coli B/r. Cold Spring Harbor Symp.  
Quant. Biol. 33: 823-828.
  - 22 CLARK, D.J. and MAALØE, O. 1967. DNA replication and the di-  
vision cycle in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 23: 99-112 .
  - 23 COOPER, S. and HELMSTETTER, C.E. 1968. Chromosome replica-  
tion and the division cycle of Escherichia coli B/r. J. Mol.  
Biol. 31: 519-540.
  - 24 COOPER, S., SCHWIMMER, M. and SCALON, S. 1978. Probabilis-  
tic behavior of DNA segregation in Escherichia coli. J. Bac-  
teriol. 134: 60-65.
  - 25 CULLUM, J. and VICENTE, M. 1978. Cell growth and length dis-  
tribution in Escherichia coli. J. Bacteriol. 134: 330-337 .
  - 26 CUMMINGS, D.J. 1965. Macromolecular synthesis during synchro-  
nous growth of Escherichia coli B/r. Biochim. Biophys. Acta  
85: 341-350.
  - 27 CHANDLER, M., BIRD, R.E. and CARO, L. 1975. The replication  
time of Escherichia coli K-12 chromosome as a function of  
cell doubling time. J. Mol. Biol. 94: 127-132
  - 28 CHENG, K.J., DAY, D.F., COSTERTON, J.W. and INGRAM, J.M.  
1972. Alkaline phosphatases subunits in the culture filtrate  
of Pseudomonas aeruginosa. Can. J. Biochem. 50: 268-276.

- 29 CHURCHWARD, G., ESTIVA, E. and BREMER, H. 1981. Growth rate dependent control of chromosome replication initiation in Escherichia coli. J. Bacteriol. 145: 1232-1238
- 30 DE PEDRO, M.A. 1977. Control de la división celular en Escherichia coli. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.
- 31 DE PEDRO, M.A. and CANOVAS, J.L. 1977. Induction of cell division in a temperature-sensitive division mutant of Escherichia coli by inhibition of protein synthesis. J. Gen. Microbiol. 99: 283-290.
- 32 DE PEDRO, M.A., LLAMAS, J.E. and CANOVAS, J.L. 1975. A timing control of cell division in Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 91: 307-314.
- 33 DIRIENZO, J.M., NAKAMURA, K. and INOUE, M. 1978. The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria: Biosynthesis, assembly and functions. Ann. Rev. Biochem. 47: 481-532.
- 34 DIX, D.E. and HELMSTETTER, C.E. 1973. Coupling between chromosome completion and cell division in Escherichia coli. J. Bacteriol. 115: 786-795.
- 35 DONACHIE, W.D. 1968. Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. Nature 219: 1077-1079.
- 36 DONACHIE, W.D. 1969. Control of cell division in Escherichia coli: experiments with thymine starvation. J. Bacteriol. 100: 260-268.
- 37 DONACHIE, W.D. 1974. Cell division in bacteria. p: 431-445. In Kolber, A.R. and Kohiyama, M. (ed). Mechanism and regulation of DNA replication. Plenum Publishing Corp. New York.
- 38 DONACHIE, W.D., BEGG, K.J., LUTKENHAUS, J.F., SALMOND, G.P.,

- MARTINEZ-SALAS, E. and VICENTE, M. 1979. Role of the ftsA gene product in control of Escherichia coli cell division. J. Bacteriol. 140: 388-394.
- 39 DONACHIE, W.D., BEGG, K.J. and VICENTE, M. 1976. Cell length cell growth and cell division. Nature 264: 328-333.
- 40 DONACHIE, W.D., JONES, N.C. and TEATHER, R.M. 1973. The bacterial cell cycle. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 23: 9-44.
- 41 DONACHIE, W.D. and MASTERS, M. 1969. Temporal control of gene expression in bacteria. p: 37-76. In Padilla, G.M., Whitson, G.L. and Cameron, J.L. (ed). The cell cycle. Academic Press. New York.
- 42 ECKER, R.E. and KOKAISL, G. 1969. Synthesis of protein, ribonucleic acid, and ribosomes by individual bacterial cells in balanced growth. J. Bacteriol. 98: 1219-1226.
- 43 EDLUND, T., GUSTAFSSON, P. and WOLF-WATZ, H. 1976. Effect of thymine concentration on the mode of chromosomal replication in Escherichia coli k-12. J.Mol. Biol. 108: 295-303.
- 44 FENOLL, C. 1978. Division celular en E. coli: Expresión de la mutación ts52 en distintas estirpes. Tesina de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.
- 45 FLETCHER, G., IRWIN, C.A., HENSON, J.M., FILLINGIM, C., MALONE, M.M. and WALKER, J.R. 1978. Identification of the Escherichia coli cell division gene sep and organization of the cell division-cell envelope genes in the sep-mur ftsA-envA cluster as determined with specialized transducing lambda bacteriophages. J. Bacteriol. 133: 91-100.
- 46 GEFTER, M.L., HIROTA, Y., KORNBERG, T. WECHSLER, J.A. and BARNOUX, C. 1971. Analysis of DNA polymerases II and III in mutants of Escherichia coli thermosensitive for DNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 3150-3153.

- 47 GEORGE, J. CASTELLAZZI, M. and BUTTIN, G. 1975. Prophage induction and cell division in E. coli. III Mutations sfiA and sfiB restore division in tif and lon strains and permit the expression of mutator properties of tif. Mol. Gen. Genet. 140: 309-322.
- 48 GOSS, W.A., DEITZ, W.H. and COOK, T.M. 1965. Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis. J. Bacteriol. 89: 1068-1074.
- 49 GROSSMAN, N. and RON, E.Z. 1980. Initiation of deoxyribonucleic acid replication in E. coli B: uncoupling from Mass/Deoxyribonucleic acid ratio. J. Bacteriol. 143: 100-104.
- 50 GROVER, N.B., WOLDRINGH, C.L., ZARITSKY, A. and ROSENBERG, R.F. 1977. Elongation of rod-shaped bacteria. J. theor. Biol. 67: 181-193.
- 51 GUDAS, L.J. 1976. The induction of protein X in DNA repair and cell division mutants of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 104: 567-587.
- 52 GUDAS, L.J., JAMES, R.J. and PARDEE, A.B. 1976. Evidence for the involvement of an outer membrane protein in DNA initiation. J. Biol. Chem. 251: 3470-3479.
- 53 GUDAS, L.J. and MOUNT, D.W. 1977. Identification of the recA (tif) gene product of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5280-5284.
- 54 GUDAS, L.J. and PARDEE, A.B. 1975. Model for regulation of Escherichia coli DNA repair functions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 2330-2334.
- 55 HANAWALT, P.C. and WAX, R. 1964. Transcription of a repressed gene: evidence that it requires DNA replication. Science 145: 1061-1063.

- 56 HELMSTETTER, C.E. 1969. Methods for studying the microbial division cycle. p: 327-363. In Norris, J.R. and Ribbons, D. W. (ed). Methods in Microbiology 1. Academic Press. New Yrk.
- 57 HELMSTETTER, C.E. and COOPER, S. 1968. DNA synthesis during the division cycle of rapidly growing Escherichia coli B/r. J. Mol. Biol. 31: 507-518.
- 58 HELMSTETTER, C.E., COOPER, O., PIERUCCI, O. and REVELAS, E. 1968. The bacterial life sequence. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33: 809-822.
- 59 HELMSTETTER, C.E. and CUMMINGS, D.J. 1964. An improved method for the selection of bacterial cells at division. Biochim. Biophys. Acta 82: 608-610.
- 60 HELMSTETTER, C.E. and PIERUCCI, O. 1968. Cell division during inhibition of DNA synthesis in Escherichia coli. J. Bacteriol. 95: 1627-1633.
- 61 HELMSTETTER, C.E. and PIERUCCI, O. 1976. DNA synthesis during the division cycle of three substrains of Escherichia coli B/r. J. Mol. Biol. 102: 477-486.
- 62 HELMSTETTER, C.E., PIERUCCI, O., WEINBERGER, M. HOLMES, M. and TANG, M. 1979. Control of cell division in Escherichia coli. p: 517-519. In Gunsalus, I.C. (ed in chief) and So-katch, J.R. and Ornston, L.N. (vol. ed) . The Bacteria: A treatise on structure and function VII: Mechanisms of adaptation. Academic Press. New York.
- 63 HEPPEL, L.A. 1967. Selective release of enzymes from bacteria. Science 156: 1451-1455.
- 64 HEPPEL, L.A. 1969. The effect of osmotic shock on release of bacterial proteins and on active transport. J. Gen. Physiol. 54: 95-109.

- 65 HIROTA, Y. JACOB, F., RYTER, A., BUTTIN, G. and NAKAI, H. 1968. On the process of cellular division in Escherichia coli. I. Asymmetrical cell division and production of deoxyribonucleic acid-less bacteria. J. Mol. Biol. 35: 175-192.
- 66 HIROTA, Y. and RICARD, M. 1972. Production of DNA-less bacteria. p: 29-50. In Bonotto, S. Goutier, R., Kirchmann, R. and Maisin, J.R. (ed). Biology and radiobiology of anucleate systems. vol I. Academic Press. New York.
- 67 HIROTA, Y., RICHARD, M. and SHAPIRO, B. 1971. The use of thermosensitive mutants of E. coli in the analysis of cell division. p: 12-31. In Manson, L.A. (ed). Biomembranes 2. Plenum Publishing Co. New York.
- 68 HIROTA, Y., RYTER, A. and JACOB, F. 1968. Thermosensitive mutants of E. coli affected in the process of DNA synthesis and cellular division. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33: 677-693.
- 69 HOFFMAN, B., MESSER, W. and SCHWARTZ, U. 1972. Regulation of polar cap formation in the life cycle of Escherichia coli. J. Supramolec. Struct. 1: 28-37.
- 70 HORIUCHI, T., MAKI, H. and SEKIGUCHI, M. 1978. A new conditionally lethal mutator (dnaQ 49) in Escherichia coli K12. Mol. Gen. Genet. 163: 277-283.
- 71 HOWE, W.E. and MOUNT, D.W. 1975. Production of cells without deoxyribonucleic acid during thymidine starvation of lexA<sup>-</sup> cultures of Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 124: 1113-1121.
- 72 HOWE, W.E. and MOUNT, D.W. 1978. Analysis of cell division in single clones of the Escherichia coli K-12 lexA mutant. J. Bacteriol. 133: 1278-1281.



- 73 HUZYK, L. and CLARK, J. 1971. Nucleoside triphosphate pools in synchronous cultures of Escherichia coli. J. Bacteriol. 108: 74-81.
- 74 INOUE, M. 1969. Unlinking of cell division from deoxyribonucleic acid replication in a temperature sensitive deoxyribonucleic acid synthesis mutant of Escherichia coli. J. Bacteriol. 99: 842-850.
- 75 INOUE, M. 1971. Pleiotropic effect of the recA gene of Escherichia coli: Uncoupling of cell division from deoxyribonucleic acid replication. J. Bacteriol. 106: 539-542.
- 76 INOUE, M. 1979. What is the outer membrane?. p: 1-12. In Inoue, M. (ed). Bacterial outer membranes: biogenesis and functions. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- 77 INOUE, M. and PARDEE, A.B. 1970. Changes in membrane proteins and their relation to deoxyribonucleic acid synthesis and cell division of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 245: 5813-5819.
- 78 JACOB, F., BRENNER, S. and CUZIN, F. 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 329-348.
- 79 JOHNSON, B.F. 1977. Fine structure mapping and properties of mutations suppressing the lon mutation in Escherichia coli K-12 and B strains. Genet. Res. 30: 273-286.
- 80 JONES, N.C. and DONACHIE, W.D. 1973. Chromosome replication transcription and control of cell division in Escherichia coli. Nature New Biol. 243: 100-103.
- 81 KAISER, A.D. and MASUDA, T. 1970. Evidence for a prophage excision gene in λ. J. Mol. Biol. 47: 557-564.

- 82 KEPES, A. and AUTISSIER, F. 1972. Topology of membrane growth in bacteria. *Biochi. Biophys. Acta* 265: 443-469
- 83 KOCH, A.L. 1977. Does the initiation of chromosome replication regulate cell division?. *Adv. Microb. Physiol.* 69: 49-48.
- 84 KOCH, A.L. 1980. Does the variability of the cell cycle result from one or many chance events?. *Nature* 286: 80-82.
- 85 KOCH, A.L. and BLUMBERG, G. 1976. Distribution of bacteria in the velocity gradient centrifuge. *Biophys. J.* 16: 389-405.
- 86 KONRAD, B.E. 1978. Isolation of an Escherichia coli K-12 dnaE mutation as a mutator. *J. Bacteriol.* 133: 1197-1202.
- 87 KOPPES, L. 1980. Thesis Doctoral. University of Amsterdam.
- 88 KOPPES, L. and Nanninga, N. 1980. Positive correlation between size at initiation of chromosome replication in Escherichia coli and size at initiation of cell constriction. *J. Bacteriol.* 143: 89-99.
- 89 KOPPES, L., WOLDRINGH, C.L. and NANNINGA, N. 1978. Size variations and correlation of different cell cycle events in slow-growing Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 134: 423-433.
- 90 KORNBERG, A. 1980. Replication mechanisms and operations. p: 447-413. In Bartlett, A.C. (ed). *DNA replication*. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
- 91 KUBITSCHKEK, H.E. 1971. Control of cell growth in bacteria: experiments with thymine starvation. *J. Bacteriol.* 105: 472-476.
- 92 KUBITSCHKEK, H.E. 1980. Bilinear volume and surface area changes during the cell cycle of E. coli and B. subtilis. In *EM-*

- BO Workshop, Duplication of bacteria. Book of Abstracts. Noordwijkerhout, The Netherlands.
- 93 KUBITSCHKE, H.E. and FREEDMAN, M.L. 1971. Chromosome replication and the division cycle of Escherichia coli. J. Bacteriol. 107: 95-99.
  - 94 LARK, K.G., REPKO, T. and HOFFMAN, E.J. 1963. The effect of amino acid deprivation on subsequent deoxyribonucleic acid replication. Biochim. Biophys. Acta 76: 9-24.
  - 95 LEIBOWITZ, P.J. and SCHAECHTER, M. 1975. The attachment of the bacterial chromosome to the cell membrane. Int. Rev. Cytol. 41: 1-28.
  - 96 LENNOX, E.S. 1955. Transduction of linked genetic character of the host by bacteriophage P1. Virol. 1: 190-206.
  - 97 LIN, E.C., HIROTA, Y. and JACOB, F. 1971. On the process of cellular division in Escherichia coli: J. Bacteriol. 108: 375-385.
  - 98 LITTLE, J.W., EDMESTON, S.H., PACELLI, L.Z. and MOUNT, D.W. 1980. Cleavage of the E. coli lexA protein by the recA protease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3225-3229.
  - 99 LOEHR, J. and HANAWALT, P. 1977. On the termination of the DNA replication cycle in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 117: 85-94.
  - 100 LOUARN, J., PATTE, J. and LOUARN, J.M. 1977. Evidence for a fixed termination site of chromosome replication in Escherichia coli K-12. J. Mol. Biol. 115: 295-314.
  - 101 LUGTENBERG, E.J.J. and VAN SCHIJNDEL-VAN DAM, A. 1972. Temperature-sensitive mutants of Escherichia coli K-12 with low activities of the L-alanine adding enzyme and the D-alanyl-D-alanine adding enzyme. J. Bacteriol. 110: 35-40.

- 102 LUGTENBERG, E.J.J. and VAN SCHIJNDEL-VAN DAM, A. 1972. Temperature-sensitive mutants of Escherichia coli K-12 with low activity of the diaminopimelic acid adding enzyme. J. Bacteriol. 110: 41-46.
- 103 LUGTENBERG, E.J.J. and VAN SCHIJNDEL-VAN DAM, A. 1973. Temperature-sensitive mutant of Escherichia coli K-12 with an impaired D-alanine: D-alanine ligase. J. Bacteriol. 113: 96-104.
- 104 LUTKENHAUS, J.F. and DONACHIE, W.D. 1979. Identification of the ftsA gene product. J. Bacteriol. 137: 1088-1094.
- 105 LUTKENHAUS, J.F., MOORE, B.A., MASTERS, M. and DONACHIE, W.D. 1979. Individual proteins are synthesized continuously throughout the Escherichia coli cell cycle. J. Bacteriol. 138: 352-360.
- 106 LUTKENHAUS, J.F., WOLF-WATZ, H. and DONACHIE, W.D. 1980. Organization of genes in the ftsA-envA region of the E. coli genetic map and identification of a new fts locus (ftsZ). J. Bacteriol. 142: 615-620.
- 107 LUTKENHAUS, J.F. and WU, H.C. 1980. Determination of transcriptional units and gene products from the ftsA region of Escherichia coli. J. Bacteriol. 143: 1281-1288.
- 108 LLAMAS, J.E. Manuscrito en preparación.
- 109 MAALØE, O. and HANAWALT, P.C. 1961. Thymine deficiency and the normal DNA replication cycle. I. J. Mol. Biol. 3: 144-145.
- 110 MAALØE, O. and KJELGAARD, N.O. 1966. The bacterial nucleus. p: 188-197. In Davis, B.D. (ed). Control of macromolecular synthesis. Microbial and molecular biology series. W.A. Benjamin Inc. New York.

- 111 MAC QUEEN, H.A. and DONACHIE, W.D. 1977. Intracellular localization and effects on cell division of a plasmid blocked in deoxyribonucleic acid replication. *J. Bacteriol.* 132: 392-397.
- 112 MARR, A.G., HARVEY, R.J. and TRENTINI, W.C. 1966. Growth and division of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 91: 2388-2389.
- 113 MARSH, R.C. and HEPBURN, M.L. 1980. Initiation and Termination of chromosome replication in Escherichia coli subjected to amino acid starvation. *J. Bacteriol.* 142: 236-242.
- 114 MARTINEZ-SALAS, E., MARTIN, J.A. and VICENTE, M. 1981. Relationship of Escherichia coli density to growth rate and cell age. *J. Bacteriol.* 147: 97-100.
- 115 MARTINEZ-SALAS, E. and VICENTE, M. 1980. Amber mutation affecting the length of Escherichia coli cells. *J. Bacteriol.* 144: 532-541.
- 116 MARUNOUCHI, T. and MESSER, W. 1973. Replication of a specific terminal chromosome segment in Escherichia coli which is required for cell division. *J. Mol. Biol.* 78: 211-228.
- 117 MARVIN, D.A. 1968. Control of DNA replication by membrane. *Nature* 219: 485-486.
- 118 MASTERS, M. 1977. Frequency of P1 transduction of genes of Escherichia coli as a function of chromosomal position. Preferential transduction of origin of replication. *Molec. Gen. Genet.* 155: 197-202.
- 119 MC ENTEE, K. 1977. Protein X is the product of the recA gene of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5275-279.
- 120 MEACOCK, P.A. and PRITCHARD, R.H. 1975. Relationship between chromosome replication and cell division in a thymineless mutant of Escherichia coli B/r. *J. Bacteriol.* 122: 931-942.

- 121 MEACOCK, P.A., PRITCHARD, R. H. and ROBERTS, E.M. 1978. Effect of thymine concentration on cell shape in thy<sup>-</sup> Escherichia coli B/r. J. Bacteriol. 133: 320-328.
- 122 MITCHISON, J.M. and VINCENT, W.S. 1965. Preparation of synchronous cell cultures by sedimentation. Nature 205: 987-989.
- 123 MUNCH-PETERSEN, A. 1970. Deoxyribonucleoside catabolism and thymine incorporation in mutants of Escherichia coli lacking deoxyriboaldolase. Europ. J. Biochem. 15: 191-202.
- 124 NIKAIDO, H. 1979. Nonspecific transport through the outer membrane. p: 361-407. In Inouye, M. (ed). Bacterial outer membranes: biogenesis and functions. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- 125 NISHIMURA, Y., TAKEDA, Y., NISHIMURA, A., SUZUKI, H., INOUE, M. and HIROTA, Y. 1977. Synthetic col E1 plasmids carrying genes for cell division in Escherichia coli. Plasmid 1: 67-77.
- 126 NORMARK, S. 1970. Genetics of a chain forming mutant of Escherichia coli. Transduction and dominance of the envA gene mediating increased penetration to some antibacterial agents. Genet. Res. 16: 63-78.
- 127 NORMARK, S., BOMAN, H.G. and BLOOM, G.D. 1971. Cell division in a chain forming envA mutant of Escherichia coli K-12. Fine structure of division sites and effects of EDTA, lysozyme and ampicillin. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 79: 651-664.
- 128 NORMARK, K.L., NORLANDER, L., GRUNDSTROM, T., BLOOM, G.D., BOQUEL, P. and FRELAT, G. 1976. Septum formation-defective mutant of Escherichia coli. J. Bacteriol. 128: 401-412.
- 129 NURSE, P. 1980. Cell cycle control - both deterministic and

probabilistic. *Nature* 286: 9-10

- 130 ONKEN, A. and MESSER, W. 1973. Cell division in Escherichia coli septation during synchronous growth. *Molec. Gen. Genet.* 127: 349-358.
- 131 OSBORN, M.J. and WU, H.C. 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 369-422.
- 132 PIERUCCI, O. 1978. Dimensions of Escherichia coli at various growth rates: model for envelope growth. *J. Bacteriol.* 135: 559-574.
- 133 PIERUCCI, O. 1979. Phospholipid synthesis during the cell division cycle of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 138: 453-460
- 134 PIERUCCI, O. and HELMSTETTER, C.E. 1969. Chromosome replication, protein synthesis and cell division in Escherichia coli. *Fed. Proc.* 28: 1755-1760.
- 135 PIERUCCI, O. and ZUCHOWSKI, C. 1973. Non-random segregation of DNA strands in Escherichia coli B/r. *J. Mol. Biol.* 80: 477-503.
- 136 POOLE, R.K. 1977. Fluctuations in buoyant density during the cell cycle of Escherichia coli K-12: significance for the preparation of synchronous cultures by age selection. *J. Gen. Microbiol.* 98: 177-186.
- 137 POWELL, E.O. 1956. Growth rate and generation time of bacteria, with special reference to continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 15: 492-511.
- 138 PREVIC, E. and RICHARDSON, S. 1969. Growth - physiological changes in Escherichia coli and other bacteria during division inhibition by 5-diazouracil. *J. Bacteriol.* 97: 416-425.

- 139 PRITCHARD, R.H. 1968. Control of DNA synthesis in bacteria. *Heredity* 23: 472-480.
- 140 PRITCHARD, R.H. 1974. On the growth and form of a bacterial cell. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 267: 303-336.
- 141 PRITCHARD, R.H., BARTH, P.T. and COLLINS, J. 1969. Control of DNA synthesis in bacteria. *In* *Microbial Growth. Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 19: 263-297.
- 142 PRITCHARD, R.H., MEACOCK, P. and ORR, E. 1978. Diameter of cells of a thermosensitive dnaA mutant of Escherichia coli cultivated at intermediate temperatures. *J. Bacteriol.* 135: 575-580.
- 143 PRITCHARD, R.H., and ZARITSKY, A. 1970. Effect of thymine on the replication velocity of DNA in thymineless mutant of Escherichia coli. *Nature* 226: 126-131.
- 144 RICARD, M. and HIROTA, Y. 1973. Process of cellular division in Escherichia coli: physiological study on thermosensitive mutants defective in cell division. *J. Bacteriol.* 116: 314-322.
- 145 RYTER, A., HIROTA, Y. and JACOB, F. 1968. DNA-membrane complex and nuclear segregation in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33: 669-676.
- 146 RYTER, A., HIROTA, Y. and SCHWARZ, U. 1973. Process of cellular division in Escherichia coli growth pattern of E. coli murein. *J. Mol. Biol.* 78: 185-195.
- 147 RYTER, A., SHUMAN, H. and SCHWARTZ, M. 1975. Integration of the receptor for bacteriophages lambda in the outer membrane of Escherichia coli: coupling with cell division. *J. Bacteriol.* 122: 295-301.
- 148 SALMOND, G.P.C., LUTKENHAUS, J.F. and DONACHIE, W.D. 1980.



- Identification of new genes in a cell envelope-cell division gene cluster of Escherichia coli: cell envelope gene murG. J. Bacteriol. 144: 438-440.
- 149 SARGENT, M.G. 1975. Anucleate cell production and surface extension in a temperature-sensitive chromosome initiation mutant of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 123: 1218-1234.
- 150 SARGENT, M.G. 1977. Macromolecular synthesis in chromosome initiation mutants of Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet. 155: 329-338.
- 151 SATTA, G. and PARDEE, A.B. 1978. Inhibition of Escherichia coli division by protein X. J. Bacteriol. 133: 1492-1500.
- 152 SCHAECHTER, M. 1961. Patterns of cellular control during unbalanced growth. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26: 53-62.
- 153 SCHAECHTER, M., MAALØE, O. and KJELDGAARD, N.O. 1958. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of Salmonella typhimurium. J. Gen. Microbiol. 19: 592-606.
- 154 SCHNAITMAN, C.A. 1974. Outer membrane proteins of Escherichia coli. IV. Differences in outer membrane proteins due to strain and cultural differences. J. Bacteriol. 118: 454-464.
- 155 SCHUBACH, W.H., WHITMER, J.D. and DAVERN, C.I. 1973. Genetic control of DNA initiation in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 74: 205-221.
- 156 SCHWARZ, U., RYTER, A., RAMBACH, A., HELLIO, R. and HIROTA, Y. 1975. Process of cellular division in Escherichia coli: differentiation of growth zone in the sacculus. J. Mol. Biol. 98: 749-760.
- 157 SHANNON, K.P., SPRATT, B.G. and ROWBURY, R.J. 1972. Cell di

vision and the production of cells lacking nuclear bodies in a mutant of Salmonella typhimurium. Mol. Gen. Genet. 118: 185-197.

- 158 SHIELDS, R. 1978. Further evidence for a random transition in the cell cycle. Nature 273: 755-758.
- 159 SLATER, M. and SCHAECHTER, M. 1974. Control of cell division in bacteria. Bacteriol. Rev. 38: 199-221.
- 160 SMITH, J.D., BARNETT, L., BRENNER, S. and RUSELL, R.L. 1970. More mutant tyrosine transfer ribonucleic acids. J. Mol. Biol. 54: 1-14.
- 161 SMITH, J.A. and MARTIN, L. 1973. Do cells cycle?. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 1263-1267.
- 162 SPRATT, B.G. 1975. Distinct penicilling binding proteins in the division, elongation and shape of Escherichia coli K12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 2999-3003.
- 163 SPRATT, B.G. 1977. Penicillin-binding proteins of Escherichia coli: general properties and characterization of mutants p: 182-190. In Schlessinger, D. (ed). Microbiology 1977. American society for Microbiology Press. New York.
- 164 SPRATT, B.G. 1977. Temperature-sensitive cell division mutants of Escherichia coli with thermolabile penicillin-binding proteins. J. Bacteriol. 131: 293-305.
- 165 SPRATT, B.G. 1978. Escherichia coli resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics through a decrease in the affinity of a target to lethality. Nature 274: 713-715.
- 166 SPRATT, B.G. The mechanism of action of penicillin. Sci. Prog. Dif. 65: 101-128.
- 167 SPRATT, B.G. and ROWBURY, R.J. 1971. Physiological and gene

- tical studies on a mutant of Salmonella typhimurium which is temperature-sensitive for DNA synthesis. Mol. Gen. Genet. 114: 35-49.
- 168 SUZUKI, H., NISHIMURA, Y. and HIROTA, Y. 1978. On the process of cellular division in Escherichia coli: a series of mutants altered in the penicillin-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 664-668.
  - 169 TANG, M. and HELMSTETTER, C.E. 1980. Coordination between chromosome replication and cell division in Escherichia coli. J. Bacteriol. 141: 1148-1156.
  - 170 TAYLOR, A.L. 1970. Current linkage map of Escherichia coli. Bacteriol. Rev. 34: 155-175.
  - 171 TEATHER, R.M., COLLINS, J.F. and DONACHIE, W.D. 1974. Quantal behavior of a diffusible factor which initiates septum formation at potential division sites in Escherichia coli. J. Bacteriol. 118: 407-413.
  - 172 THILO, L. and VIELMETTER, W. 1976. Independence of deoxyribonucleic acid replication and initiation from membrane fluidity and the supply of unsaturated fatty acids in Escherichia coli. J. Bacteriol. 128: 130-143.
  - 173 TIMSON, J. Hydroxyurea. Mut Res. 32: 115-132.
  - 174 TIPPER, D.J. and WRIGHT, A. 1979. The structure and biosynthesis of bacterial cell walls. p: 291-426. In Gunsalus, I. C. (ed in chief) and Sokatch, J.R. and Ornston, L.N. (vol ed) The bacteria: a treatise on structure and function VII: mechanisms of adaptation. Academic Press. New York.
  - 175 TOMASZ, A. 1979. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins. Ann. Rev. Microbiol. 33: 113-137.
  - 176 TORMO, A. 1978. Relación del gen divA con el período de re-

plicación del DNA y la morfogénesis en Escherichia coli. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.

- 177 TRUEBA, F.J. and WOLDRINGH, C.L. 1980. Changes in cell diameter during the division cycle of Escherichia coli. J. Bacteriol. 142: 869-878.
- 178 VAN DE PUTTE, P., VAN DILLEWIJN and RORSH, A. 1964. The selection of mutants of Escherichia coli with impaired cell division at elevated temperature. Mutant. Res. 1: 121-128.
- 179 WALKER, J.R. and KOVARICK, A. 1975. Strain-specific difference that affects the inhibition of division of Escherichia coli filaments by chloramphenicol. J. Bacteriol. 123: 752-54.
- 180 WALKER, J.R., KOVARICK, A., ALLEN, J.S. and GUSTAFSON, R.A. 1975. Regulation of bacterial cell division: temperature-sensitive mutants of Escherichia coli that are defective in septum formation. J. Bacteriol. 123: 693-703.
- 181 WALKER, J.R. and PARDEE, A.B. 1968. Evidence for a relationship between deoxyribonucleic acid metabolism and septum formation in Escherichia coli. J. Bacteriol. 95: 123-131.
- 182 WECHSLER, J.A. and GROSS, J.D. 1971. Escherichia coli mutants temperature-sensitive for DNA synthesis. Mol. Gen. Genet. 113: 273-284.
- 183 WERWER, R.W.E., NANNINGA, N., KECK, W. and SCHWARZ, U. 1978. Arrangement of glycan chains in the sacculus of Escherichia coli. J. Bacteriol. 136: 723-729.
- 184 WICKNER, S.H. 1978. DNA replication proteins of Escherichia coli. Ann. Rev. Biochem. 47: 1163-1191.
- 185 WICKNER, S.H. and HURWITZ, J. 1975. Interaction of Escherichia coli dnaB and dnaC(D) gene products in vitro. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 72: 921-925.

- 186 WIJSMAN, H.J. 1972. A genetic map of several mutations affecting the mucopeptide layer of Escherichia coli. Genet. Res. 20: 65-74.
- 187 WIJSMAN, H.J. and KOOPMAN, C.R. 1976. The relation of the genes envA and ftsA in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 147: 99-102.
- 188 WITKIN, E.M. 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible deoxyribonucleic acid repair in Escherichia coli. Bacteriol. Rev. 40: 869-907.
- 189 WOLDRINGH, C.L. 1976. Morphological analysis of nuclear separation and cell division during the life cycle of Escherichia coli. J. Bacteriol. 125: 248-257.
- 190 WOLDRINGH, C.L., DE JONG, M.A., VAN DEN BERG, W. and KOPPEL, L. 1977. Morphological analysis of the division cycle of two Escherichia coli substrains during slow growth. J. Bacteriol. 131: 270-279.
- 191 WOLF-WATZ, H. and MASTERS, M. 1979. Deoxyribonucleic acid and outer membrane: strains diploid for the oriC region show elevated levels of deoxyribonucleic acid-binding protein and evidence for specific binding of the oriC region to outer membrane. J. Bacteriol. 140: 50-58.
- 192 WOLF-WATZ, H. and NORMAN, S. 1976. Evidence for role of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase in septum separation in Escherichia coli. J. Bacteriol. 128: 58-586.
- 193 WOLF-WATZ, H. and NORQUIST, A. 1979. Deoxyribonucleic acid and outer membrane: binding to outer membrane involves a specific protein. J. Bacteriol. 140: 43-49.

- 194 WRIGHT, A. and TIPPER, D.J. 1979. The outer membrane of gram negative bacteria. p: 427-485. In Gunsalus, I.C. (ed in chief) and Sokatch, J.R. and Ornston, L.N. (vol ed). The bacteria: a treatise on structure and function VII: mechanisms of adaptation. Academic Press. New York.
- 195 WU, T.T. 1966. A model for three-point analysis of random general transduction. Gen. 54: 405-410.
- 196 YASUDA, S. and HIROTA, Y. 1977. Cloning and mapping of the replication origin of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5458-5462.
- 197 YOSHIKAWA, H., O'SULLIVAN, A. and SUEOKA, N. 1964. Sequential replication of the Bacillus subtilis. III. Regulation of initiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52: 973-980.
- 198 ZARITSKY, A. 1975. On dimensional determination of rod-shaped bacteria. J. Theor. Biol. 54: 243-248.
- 199 ZARITSKY, A. and PRITCHARD, R.H. 1973. Changes in cell size and shape associated with changes in the replication time of the chromosome of Escherichia coli. J. Bacteriol. 114: 824-37.
- 200 ZUSMAN, D.R., CARBONELL, A.R. and HAGA, J.Y. 1973. Nucleoid condensation and cell division in Escherichia coli MX74T2 ts52 after inhibition of protein synthesis. J. Bacteriol. 115: 1167-1178
- 201 ZUSMAN, D.R., INOUE, M. and PARDEE, A.B. 1972. Cell division in Escherichia coli: evidence for regulation of septation by effector molecules. J. Mol. Biol. 69: 119-136.
- 202 ZYSKIND, J.W., DEEN, L.T. and SMITH, D.W. 1977. Temporal sequence of events during the initiation process in Escherichia coli deoxyribonucleic acid replication: roles of the dnaA and dnaC gene products and ribonucleic acid polymerase. J. Bacteriol. 129: 1466-1475.

